



Università degli Studi di Pisa

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Conservazione ed Evoluzione

Tesi di Laurea

**Biologia riproduttiva di *Crocus etruscus* Parl.  
(Iridaceae), endemita toscano**

Relatore:

Dott. Gianni Bedini

Candidata:

Sara Campigli

Correlatore:

Dott. Angelino Carta

Anno Accademico 2012/2013

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	8
<b>1.1. Inquadramento tassonomico del genere <i>Crocus</i> L. (Iridaceae)</b> .....	8
<b>1.2. <i>Crocus etruscus</i> Parl.</b> .....	14
<b>1.3. La morfologia dell'apparato sessuale</b> .....	16
<b>1.4. Distribuzione della specie</b> .....	17
<b>1.5. Scopo dello studio</b> .....	18
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	19
<b>2.1. Caratterizzazione dell'area di studio</b> .....	19
<b>2.2. Prove di impollinazione</b> .....	22
<b>2.3. Calcolo di <i>fruit set</i> e <i>seed set</i></b> .....	27
<b>2.4. Misurazioni della massa dei semi</b> .....	28
<b>2.5. Analisi statistiche</b> .....	29

<b>3. RISULTATI</b>	31
<b>3.1. <i>Fruit set</i> e <i>seed set</i></b>	31
<b>3.2. Distanza stigma-antere</b>	36
<b>3.3. Massa semi</b>	40
<b>3.4. Indici di compatibilità</b>	43
 <b>4. DISCUSSIONE</b>	 44
<b>4.1. <i>Fruit set</i> e <i>seed set</i></b>	44
<b>4.2. Distanza stigma-antere</b>	45
<b>4.3. Massa semi</b>	48
<b>4.4. Indici di compatibilità</b>	49
<b>4.5. Discussione metodologica</b>	49
 <b>5. CONCLUSIONI</b>	 51
 <b>6. LETTERATURA CITATA</b>	 53
 <b>7. APPENDICE</b>	 60
 <b>RINGRAZIAMENTI</b>	 67

## RIASSUNTO

*Crocus etruscus* Parl. (Iridaceae) è una specie vegetale endemica della Toscana meridionale, che vive soprattutto ai margini dei boschi decidui submediterranei. La specie è inserita nella Lista Rossa Nazionale e Globale IUCN con lo status NT, inoltre è inclusa nell'Allegato IVb della Direttiva Habitat e nell'Allegato I della Convenzione di Berna.

L'autoincompatibilità è diffusa nel genere *Crocus*. Scopo del lavoro di tesi è quello di a) verificare la presenza o il grado di autoincompatibilità in *Crocus etruscus* in relazione alla variabilità della lunghezza dello stilo rapportata con la posizione delle antere; b) quantificare le relazioni tra posizione reciproca degli organi sessuali e *fitness* riproduttiva, attraverso l'analisi dell'effetto dei diversi sistemi di impollinazione e del grado di separazione spaziale tra gli organi sessuali. La *fitness* è quantificata considerando la quantità di frutti e semi, e la massa dei semi prodotti.

Lo studio sulla specie si è sviluppato *in situ*, presso la popolazione di Sassetta (Castagneto Carducci, Livorno). Con questi esemplari sono state effettuate prove di impollinazione manuale: autogamia spontanea e forzata dei fiori a stilo lungo e stilo corto, e tutte le possibili combinazioni di incrocio; inoltre è stata campionata la variabilità dell'altezza dello stigma in individui scelti casualmente. Su tutti i frutti e semi prodotti è stato calcolato il *fruit set* e *seed set*, e sui semi ricavati dai trattamenti è stata misurata la massa per poterla rapportare con la *fitness* derivante dalle varie tipologie di impollinazione. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando la regressione logistica, l'ANOVA, altri test statistici diffusi ed alcuni indici quali il *Self-Compatibility Index*, il *Selfing Rate* e il *Self-Incompatibility Index*.

Per quanto riguarda la morfologia fiorale, il tratto principale è la posizione dello stigma, che varia senza soluzione di continuità da più in alto a più in basso rispetto alle antere, per questo motivo tale caratteristica può essere definita “monomorfismo” dell'altezza dello stigma; minore è la distanza stigma-antere, maggiore è il numero di semi prodotto. L'impollinazione incrociata tra i morfi Short e Long non porta a differenze significative

nella quantità di frutti e semi prodotti. La separazione tra stigma e antere può limitare il più possibile l'autoimpollinazione. La specie risulta parzialmente autoincompatibile. La riproduzione per via apomittica non risulta invece possibile.

## ABSTRACT

*Crocus etruscus* Parl. (Iridaceae) is a plant species endemic to southern Tuscany, where it grows mainly at the edge of Sub-Mediterranean deciduous forests. The species is included in the National and Global IUCN Red List with the status NT; it is also included in Annex IVb of the Habitats Directive and Annex I of the Bern Convention.

Self-incompatibility is widespread in the genus *Crocus*. The aims of this work are a) verify the presence or the degree of self-incompatibility in *Crocus etruscus* related to the variability of the stylus' length in relation with the position of the anthers; b) quantify the relationship between the mutual position of the sexual organs and reproductive *fitness*, through the analysis of the effect of different systems of pollination and the degree of spatial separation between sexual organs. The *fitness* is quantified considering the amount of fruits and seeds, and the mass of seeds produced.

The study on the species was carried out *in situ*, in the population of Sassetta (Castagneto Carducci, Livorno). I carried out various kind of hand pollination experiments on single individuals: selfing, spontaneous and forced, of long-styled and short-styled flowers, and all possible cross combinations; then I sampled the variability in the length of the stylus in randomly chosen individuals. On all fruits and seeds produced I calculated *fruit set* and *seed set*, and I measured the mass of seeds obtained from the different treatments, to relate with the *fitness* resulting from various types of pollination. Statistical analyses were performed using logistic regression, ANOVA, other statistical tests and indices such as the *Self-Compatibility Index*, the *Selfing Rate* and the *Self-Incompatibility Index*.

Regarding the flower morphology, the main feature is the position of the stigma, which varies seamlessly from higher to lower than the anthers, for this reason this characteristic can be defined stigma height "monomorphism"; the shorter the distance stigma-anthers, the greater the number of seeds produced. Cross-pollination between Short and Long morphs does not lead to significant differences in the amount of fruits and seeds produced. Separation between stigma and anthers results in limiting as much

as possible self-pollination; the species is partially self-incompatible. The reproduction by apomixis is not possible.

## 1. INTRODUZIONE

La biodiversità, intesa come l'insieme di tutte le forme viventi geneticamente diverse e degli ecosistemi ad esse correlati, negli ultimi anni è stato argomento di molti dibattiti.

La Convenzione di Rio, sancita nel 1992, stabilisce che grande attenzione deve essere rivolta alla conservazione di tutte le specie animali e vegetali presenti sulla Terra, e riconosce che negli ultimi decenni l'uomo ha egoisticamente adattato il mondo in cui vive a sé stesso, a scapito di altri esseri viventi, con conseguente diminuzione in numero o estinzione di altre specie. Per questo la conservazione della natura è diventata una disciplina molto importante, fondamentale, per permettere la sopravvivenza delle specie che rischiano la scomparsa, in primis a causa dell'uomo (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2005).

Per riuscire nell'intento di conservazione, è fondamentale approfondire l'ecologia e la fisiologia delle specie da salvaguardare, in modo che i piani per la conservazione possano essere progettati nel miglior modo possibile, tenendo conto di tutte le esigenze delle specie (Guccione & Schilleci, 2010).

Il modello utilizzato per studiare queste tematiche in questo lavoro di tesi è *Crocus etruscus* Parl. La scelta è ricaduta su questa specie, in quanto si è rivelata molto interessante per alcune sue caratteristiche morfologiche, per la sua presenza esclusiva nella Toscana centro-meridionale (Carta & al., 2010), e per le scarse o nulle conoscenze funzionali. La specie risulta prossima allo stato di rischio, per cui è importante effettuare uno studio e avviare un monitoraggio prima dell'insorgenza di gravi minacce.

### 1.1. Inquadramento tassonomico del genere *Crocus* L. (Iridaceae)

*Crocus* L. è un genere di piante erbacee perenni, angiosperme, monocotiledoni, che presentano una tipica corolla a forma di coppa la quale prosegue in basso con un lungo tubo. Le specie di questo genere sono tutte geofite. Il fiore è generalmente solitario, ermafrodita, di colore giallo o con tonalità che variano dal bianco al viola; il perigonio è



costituito da 6 segmenti (2 verticilli di 3 tepali) che sono saldati alla base in un tubo e liberi superiormente a formare lacinie; la gola del perigonio può essere bianca, gialla o dello stesso colore del resto del perigonio, glabra o pubescente; gli stami sono 3, liberi, l'ovario è infero ed è formato da 3 carpelli concresciuti; lo stilo può essere più o meno ramificato a seconda della specie, gli stigmi sono più o meno allargati ad imbuto, all'apice interi, lobati o sfrangiati. Il frutto è una capsula loculicida triloculare, che contiene molti semi. Dopo la deiscenza del frutto, i semi cadono vicino alla pianta madre e vengono dispersi prevalentemente dalle formiche (mirmecocoria); i semi presentano un'appendice, chiamata strofiolo, che può essere più o meno visibile ed attrae le formiche. Il cormo consiste in un bulbo-tubero che presenta una forma appiattita, sub-globosa o ovoidale, ed è interamente avvolto da tuniche, guaine membranose o costituite da fibre filiformi (Mathew, 1982). Le radici sono prodotte alla base del cormo e generalmente si presentano fascicolate. Le foglie sono basali e si originano direttamente dal bulbo-tubero, la forma è lineare o lineare-lanceolata, e possiedono una caratteristica linea longitudinale mediana biancastra; il loro numero, la misura, la struttura e la presenza o meno di peli, sono molto variabili tra le specie. Lo scapo è breve rispetto al resto della pianta e rimane sotto il terreno fino alla formazione del frutto, successivamente si allunga trasportando il frutto in alto. La fioritura può essere primaverile o autunnale, a seconda della specie. L'impollinazione è prevalentemente entomofila.

Spesso i semi presentano dormienza di tipo morfofisiologico (MPD) (Baskin & Baskin, 2004). Nell'intero genere è altamente diffusa l'autoincompatibilità (Grilli Caiola & Canini, 2010).

Questo genere, secondo la classificazione APG III (2009), può essere collocato nel Regno Plantae, Phylum Charophyta, Classe Embryopsida, Sottoclasse Magnoliidae, Ordine Asparagales, Famiglia Iridaceae.

Il genere *Crocus* è composto da oltre 100 specie, distribuite dall'Europa occidentale e l'Africa del nord, alla Cina occidentale (Harpke & al., 2013). In Italia fino ad oggi sono state elencate 16 specie, di cui 5 endemiche: *C. etruscus* Parl. (Toscana centro-meridionale), *C. imperati* Ten. (Italia centro-meridionale), *C. suaveolens* Bertol. (Italia

centro-meridionale), *C. ilvensis* Peruzzi & Carta (Isola d'Elba) e *C. siculus* Tineo (Sicilia) (Conti & al., 2005; Del Guacchio & Caputo, 2008; Carta & al., 2010; Peruzzi & Carta, 2011). La specie maggiormente conosciuta, ampiamente coltivata a fini alimentari, è *Crocus sativus* L. (entità sterile di origine ibrida artificiale), dai cui stigmi si ricava lo zafferano.



E)



Figura 1. I 5 crochi endemici dell'Italia: A) *C. imperati*; B) *C. suaveolens*; C) *C. ilvensis* (da Peruzzi & Carta, 2011); D) *C. siculus*; E) *C. etruscus*, a destra della foto un'iconografia dell'individuo completo effettuata su materiale fresco proveniente dal *locus classicus*; delineavit Anne Maury (da Carta & al., 2010).

Il genere *Crocus* presenta un'estrema variabilità cariologica, con una serie quasi continua di numeri cromosomici (da  $2n = 6$  a  $2n = 70$ ); frequente nel genere è la presenza di cromosomi B, disploidia e serie poliploidi, ciò comporta un alto grado di segregazione delle specie, il che determina molti problemi di classificazione (Pignatti, 1982; Harpke & al., 2013).

La classificazione interna al genere è stata definita da Mathew (1982) in base ad alcuni caratteri morfologici, e risulta essere la seguente:

1) Sottogenere *Crocus*

a) Sezione *Crocus*

Serie: *Kotschyani* Mathew; *Longiflori* Mathew; *Scardici* Mathew;  
*Verni* Mathew; *Versicolores* Mathew; *Crocus*

b) Sezione *Nudiscapus* Mathew

Serie: *Aleppici* Mathew; *Biflori* Mathew; *Carpetani* Mathew; *Flavi* Mathew; *Intertexti* (Maw) Mathew; *Laevigatae* Mathew; *Orientales* Mathew; *Reticulati* Mathew; *Speciosi* Mathew

2) Sottogenere *Crociris* (Schur) Mathew

Questa classificazione è stata almeno in parte rigettata successivamente da Harpke & al. (2013), con indagini filogenetiche basate sull'analisi di un *locus* plastidiale (*trnL-trnF* IGS) e due *loci* nucleari (regione ITS e parte del gene pCOSAt103). Secondo questi autori, solo 8 delle 15 serie risultano monofiletiche (*Crocus*, *Kotschyani*, *Scardici*, *Aleppici*, *Carpetani*, *Laevigatae*, *Orientales*, *Speciosi*). Le due serie che racchiudono il maggior numero di specie, *Biflori* e *Reticulati*, invece risultano parafiletiche, mentre le serie *Longiflori* e *Versicolores* risultano polifiletiche. Questi risultati sono in accordo con quanto affermato da Petersen & al. (2008). Inoltre, Harpke & al. (2013) evidenziano l'esistenza di un elevato livello di omoplasia in alcuni caratteri morfologici nel genere *Crocus*, oltre alla presenza (per esempio nella serie *Crocus*) di più eventi di poliploidizzazione.

Sia *C. etruscus* che *C. ilvensis* appartengono alla serie *Verni*, e la loro presenza è limitata alla Toscana. La serie *Verni* è caratterizzata da tuniche del corno reticolato-fibrose, fioritura tardo-invernale, fiori non cospicuamente striati all'esterno, bratteole assenti (Mathew, 1982). Le specie di questa serie, come altre nell'ambito del genere *Crocus*, presentano numeri cromosomici di base molto variabili:  $x = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14$  (Peruzzi & al., 2011).

Recentemente sono state indagate le relazioni filogenetiche tra *C. etruscus* e *C. ilvensis*, utilizzando due marcatori nucleari (regione ITS e parte del gene pCOSAt103) ed un marcatore plastidiale (*trnL-trnF* IGS). Tutti e tre i marcatori confermano un'estrema affinità tra le due specie (Peruzzi & al., 2011). Analisi morfologiche ed UPGMA (Figura 2) effettuate da Peruzzi & Carta (2011) mostrano la presenza in *C. ilvensis* di caratteri intermedi tra *C. etruscus* e *C. vernus*, ma la specie mantiene comunque una combinazione di stati del carattere che permettono di riconoscerlo come un'entità

chiaramente distinta dalle altre. *C. ilvensis* è facilmente distinguibile da *C. vernus* poiché possiede fibre del bulbo più spesse, e tepali esterni vistosamente striati; si distingue da *C. etruscus* per la fauce del perigonio, che in *C. ilvensis* è color lillà-bianco, e per i sublobi dello stigma che in quest'ultima specie risultano incisi più profondamente.

Per quanto riguarda la cariologia, il corredo cromosomico è  $2n = 8$  (numero cromosomico di base  $x = 4$ ) in tutte e tre le specie, ma la struttura del cariotipo di *C. ilvensis* è molto simile a quella di *C. etruscus* (Brighton & al., 1973; Baldini, 1990) e ben distinta da quella di *C. vernus*. Tuttavia, esiste una forte affinità nell'asimmetria del cariotipo tra *C. ilvensis*, *C. etruscus* e le popolazioni di *C. vernus* con  $x = 8$ , e questo ci suggerisce un certo grado di affinità tra queste tre specie.

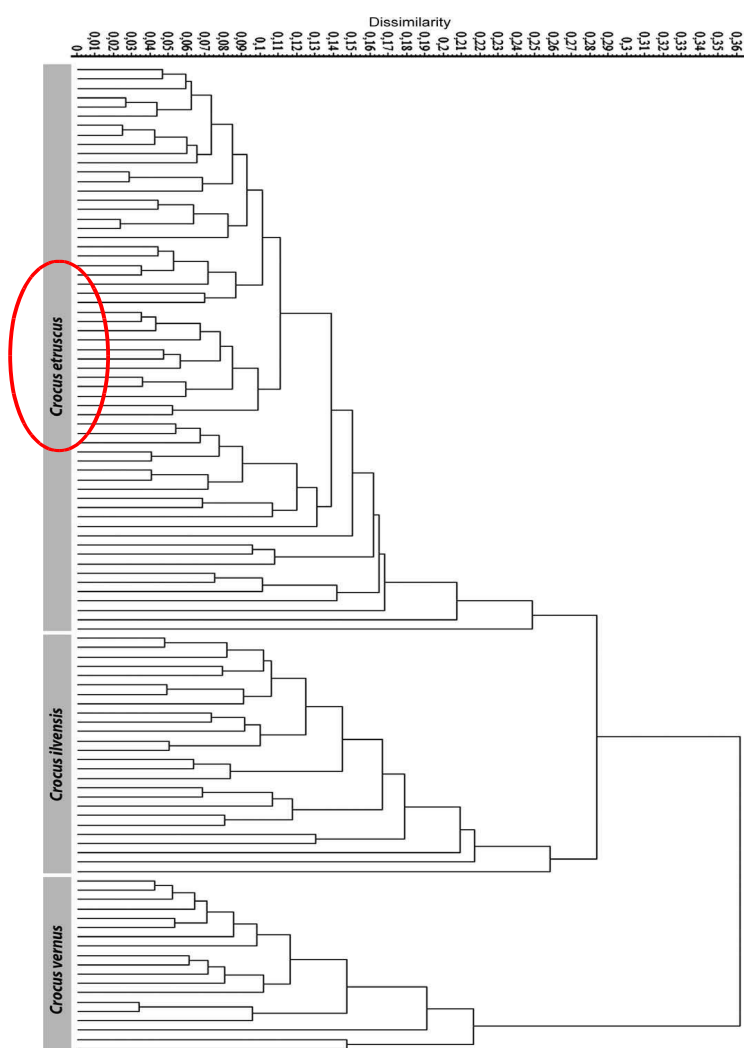


Figura 2. Dendrogramma UPGMA che mostra le relazioni morfologiche tra alcuni individui studiati di *Crocus etruscus*, *Crocus ilvensis* e *Crocus vernus* subsp. *vernus* (da Peruzzi & Carta, 2011). Si può notare l'estrema affinità tra le 3 specie, ma soprattutto tra *C. etruscus* (cerchiato in rosso) e *C. ilvensis*.



## 1.2. *Crocus etruscus* Parl.

*Crocus etruscus* Parl., il cui nome comune è Zafferano di Toscana, è una geofita bulbosa (Raunkiær, 1934), endemica della Toscana, alta 15-30 cm, caratterizzata da tuniche del cormo reticolato-fibrose, bratteole assenti, foglie in numero di 3 o 4, all'antesi lunghe 1.3-1.5 volte i fiori, larghe 2-6 mm, glabre, ottuse come troncate all'apice. I fiori sono 1 o raramente 2, di colore violaceo, fauce del perigonio giallastra e pubescente; il tubo perigoniale è lungo 4.5-7 cm, le lacinie sono lunghe 3-4 cm e larghe 0.9-1.3 cm, le esterne hanno apici acuti e presentano 3 striature nette di colore violaceo-scuro all'esterno, mentre quelle interne sono ottuse e presentano striature meno evidenti. Gli stami sono lunghi all'incirca la metà delle lacinie perigoniali, lo stilo è diviso all'apice in 3 corti rami, gli stigmi hanno l'apice appena dilatato e poco crenato. Il frutto è una capsula oblunga-ellissoidale lunga 1-1.5 cm e larga 0.8-1 cm; i semi si presentano di colore marrone-rossiccio, forma sub-globosa, e sono lunghi 2-3 mm (Parlatore, 1858; Mathew, 1982; Pignatti, 1982; Carta & al., 2010). La grandezza del cormo, il tipo di fibre e la lunghezza del tubo del perigonio dipendono tuttavia dall'età della pianta e dalla profondità del suolo. Il cormo è definito come fusto modificato e trasformato in organo di accumulo sotterraneo di sostanze di riserva per sopravvivere alla stagione avversa, con foglie squamiformi disseccate che formano la tunica; le sostanze accumulate nel cormo sono immagazzinate soprattutto nella base, più appiattita rispetto ad un bulbo, piuttosto che in squame carnose (come avviene nei bulbi).



Figura 3. Cormo di *Crocus etruscus*; si notano la tunica reticolata e le radici che si dipartono dalla base.

*Crocus etruscus* si trova indifferentemente su substrati di natura calcarea o silicea, a prevalente componente sabbiosa o argillosa, sempre drenante, come tutte le specie del genere *Crocus* (Mathew, 1982). E' una specie termofila (Selvi, 1996), le stazioni si trovano in genere a un'altitudine compresa tra circa 200 m e 800 m s.l.m. La fioritura avviene nel periodo febbraio-aprile.

Si trova soprattutto ai margini di aree boscate riferibili alle classi *Querceto roboretana* e *Querceto ilex*, risulta inoltre molto diffuso nei boschi a dominanza di *Castanea sativa* Mill. e si può trovare anche in formazioni prative in cui dominano graminacee di grossa taglia come i generi *Bromus* e *Brachypodium*.

La specie si trova su una superficie (EOO, Extent of Occurrence) di 1892 km<sup>2</sup> circa, in cui l'area realmente occupata (AOO, Area of Occupancy) è di 120 km<sup>2</sup> circa. La densità media dei popolamenti è di 10 individui/m<sup>2</sup> (Carta & al., 2010). Attualmente la specie è inserita nella lista rossa regionale con lo status LR (Lower Risk) (Conti & al., 1997); inoltre è inclusa nell'Allegato IV b della direttiva 92/43/CEE "Habitat" e nell'Allegato I della Convenzione di Berna. Considerando i criteri IUCN per l'assegnazione delle categorie di rischio (IUCN, 2001) i dati non mostrano un evidente declino della dimensione delle popolazioni (criteri A-C) o della distribuzione della specie (criterio B), inoltre le minacce alla specie non sono specifiche ma solo potenziali, da ricondurre alla degenerazione/riduzione degli habitat e alla predazione da parte di cinghiali (*Sus scrofa*). La specie si trova in nuclei di subpopolazioni isolati, ma le popolazioni sono stabili. Lo stato di conservazione di questa specie appare quindi buono, seppur dipendente dalla gestione dei boschi ai cui margini la specie spesso cresce. Nella Red List globale IUCN assume lo status NT (Near Threatened), ossia prossima allo stato di rischio e che pertanto necessita di un monitoraggio costante (Carta & al., 2010). La specie è inserita sotto la categoria NT anche nella Lista Rossa della Flora Italiana (Rossi & al., 2013) e nella Lista Rossa Europea (Bilz & al., 2011).

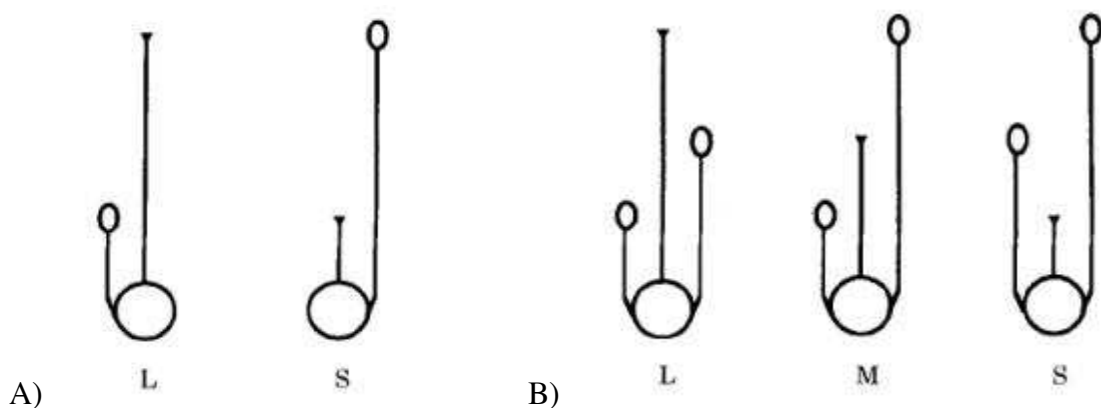
### 1.3. La morfologia dell'apparato sessuale

Una caratteristica di *Crocus etruscus* è la variazione della posizione dello stigma rispetto alle antere, che si evince dalle misurazioni riportate in Peruzzi & Carta (2011); la tipologia di variazione, il motivo di questo particolare assetto e il suo significato funzionale deve ancora essere chiarito.

Tra le più comuni tipologie di polimorfismo dello stilo nelle piante a fiore, le principali sono quattro: eterostilia, a sua volta suddivisa in distilia e tristilia; dimorfismo dell'altezza dello stigma; enantioistilia. Questi polimorfismi differiscono tra loro nella posizione relativa degli organi sessuali, e nel numero di forme fiorali (morfi) che si possono distinguere.

Nell'eterostilia, l'altezza di stigma e antere è posizionata reciprocamente nelle due (distilia) o tre (tristilia) forme fiorali. Due esempi sono rispettivamente la specie *Primula vulgaris* Huds. per la distilia, e *Lythrum salicaria* L. per la tristilia. Nel dimorfismo dell'altezza dello stigma i due morfi variano nell'altezza dello stilo, ma non nell'altezza delle antere (esempio: *Narcissus assoanus* Dufour). Nell'enantioistilia, lo stilo può essere deflesso verso il lato sinistro o destro del fiore, ad esempio nella specie *Wachendorfia paniculata* Burm. (Barrett & al., 2000).

In figura 4, le tipologie di polimorfismo sopra descritte.





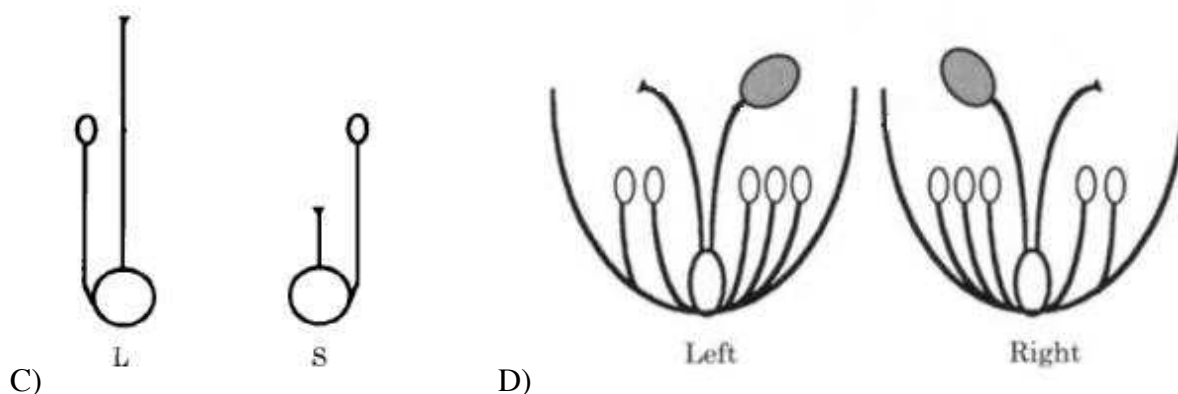


Figura 4. Le 4 tipologie principali di polimorfismo dello stilo: A) Distilia; B) Tristilia; C) Dimorfismo dell'altezza dello stigma; D) Enantiostilia. L = Long, S = Short, M = Middle. (da Barrett & al., 2000, modificato).

I vari tipi di polimorfismo dello stilo si sono originati indipendentemente in varie famiglie di piante a fiore impollinate da insetti, e sono stati interpretati come tipologie fiorali che aumentano la precisione nell'impollinazione incrociata, e riducono la perdita di opportunità di accoppiamento associate all'autogamia (Barrett & al., 2000).

#### 1.4. Distribuzione della specie

*Crocus etruscus* Parl., oggi riconosciuta quale specie endemica della Toscana, era stata precedentemente segnalata anche in altre regioni dell'Italia centro-settentrionale, in particolare Emilia-Romagna (Conti & al., 2005) e Piemonte (Mathew, 1982).

Sia per l'Emilia-Romagna che per il Piemonte, è stato verificato che l'identificazione effettuata era errata, trattandosi per entrambe di popolazioni di *Crocus vernus* (L.) Hill (Carta & al., 2010).

La specie era stata segnalata anche sull'Isola d'Elba (Fiori, 1923-1929; Arrigoni, 1974; Pignatti, 1982; Del Prete & Garbari, 1985; Corsi & Garbari, 1991; Fossi Innamorati, 1991; Gori, 1993; Signorini & al., 2002; Arrigoni & al., 2003; Foggi & al., 2006), ma la sua presenza è stata esclusa con l'attribuzione delle popolazioni elbane alla nuova specie *Crocus ilvensis* Peruzzi & Carta (Peruzzi & Carta, 2011).

Per quanto riguarda la Toscana, la specie appare diffusa nell'area centro-meridionale, in particolare nei pressi di alcune località nelle Province di Grosseto, Livorno e Siena,

nelle quali la sua presenza è stata confermata con verifiche di campagna (Carta & al., 2010). Le stazioni di Monte Pelato (Livorno) e quelle del Volterrano (Pisa) invece, sono erronee ed attribuibili a *Crocus vernus* (L.) Hill.

E' stato quindi verificato che la specie è un endemismo della Toscana centro-meridionale, da ricondurre al dominio tirrenico (Arrigoni & al., 2003).

### **1.5. Scopo dello studio**

Lo scopo del presente studio è quello di chiarire la variabilità dell'altezza dello stigma rispetto alle antere, verificare la presenza o il grado di autoincompatibilità nella specie in relazione alla variabilità della lunghezza dello stilo, precisandone il ruolo nella strategia riproduttiva della specie e quantificare le relazioni tra posizione reciproca degli organi sessuali e *fitness* riproduttiva, attraverso l'analisi dell'effetto dei diversi sistemi di impollinazione e del grado di separazione spaziale tra gli organi sessuali. La *fitness* è quantificata considerando la quantità di frutti e semi, e la massa dei semi prodotti.

## 2. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto su individui presenti *in situ* in località “Sassetta” (Castagneto Carducci, Livorno). L’attività è stata compiuta in un arco di tempo di un anno circa (settembre 2012 - settembre 2013) durante il quale sono state effettuate misure di *fitness in situ* e in laboratorio nell’Orto Botanico di Pisa.

### 2.1. Caratterizzazione dell’area di studio

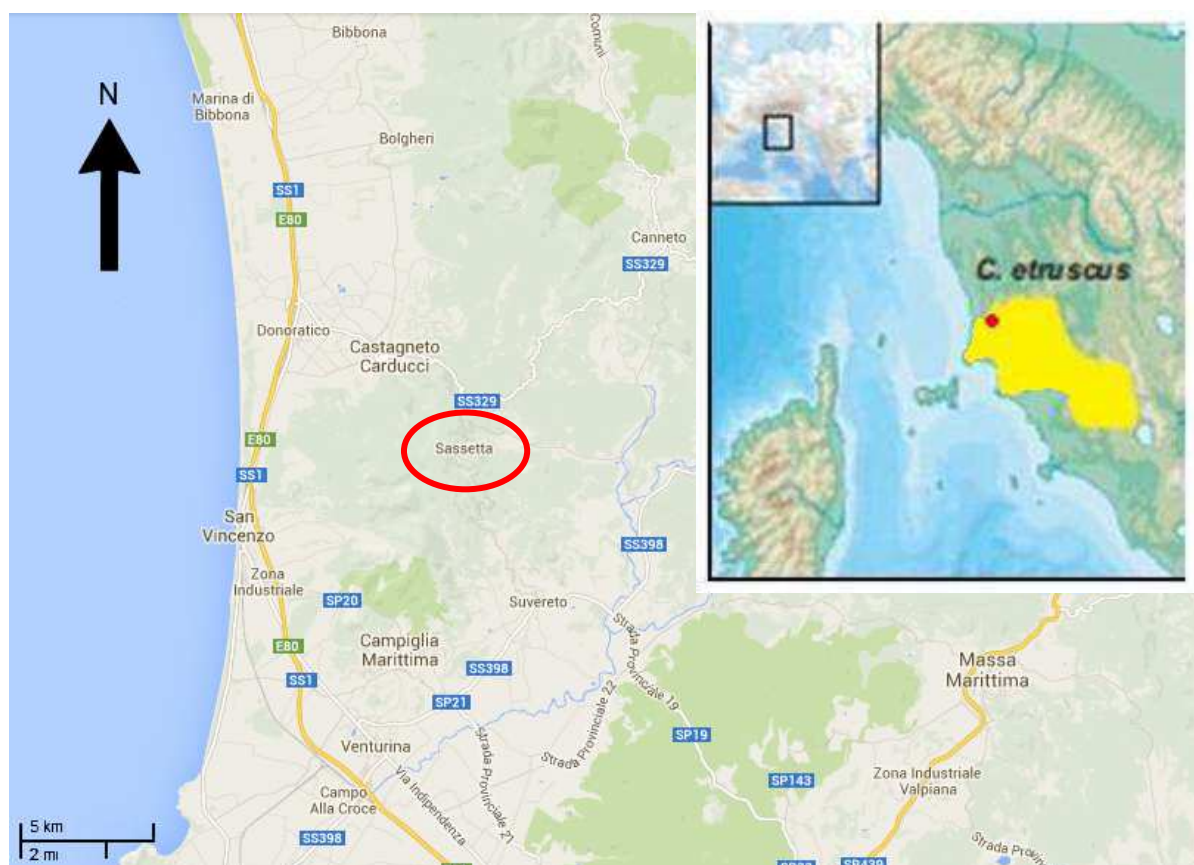


Figura 5. Ubicazione generale della località di studio. Cerchiato in rosso l’abitato di Sassetta, vicino al quale si trova la popolazione studiata (da *Google Maps*, modificato). In alto a destra, areale di distribuzione della specie; l’area delimitata in giallo indica la zona dove la specie è stata censita, in rosso la posizione di Sassetta.

Le prove sono state effettuate in 5 diverse stazioni che presentavano un'alta densità di individui, chiamate con i nomi A, B, C, D, E.

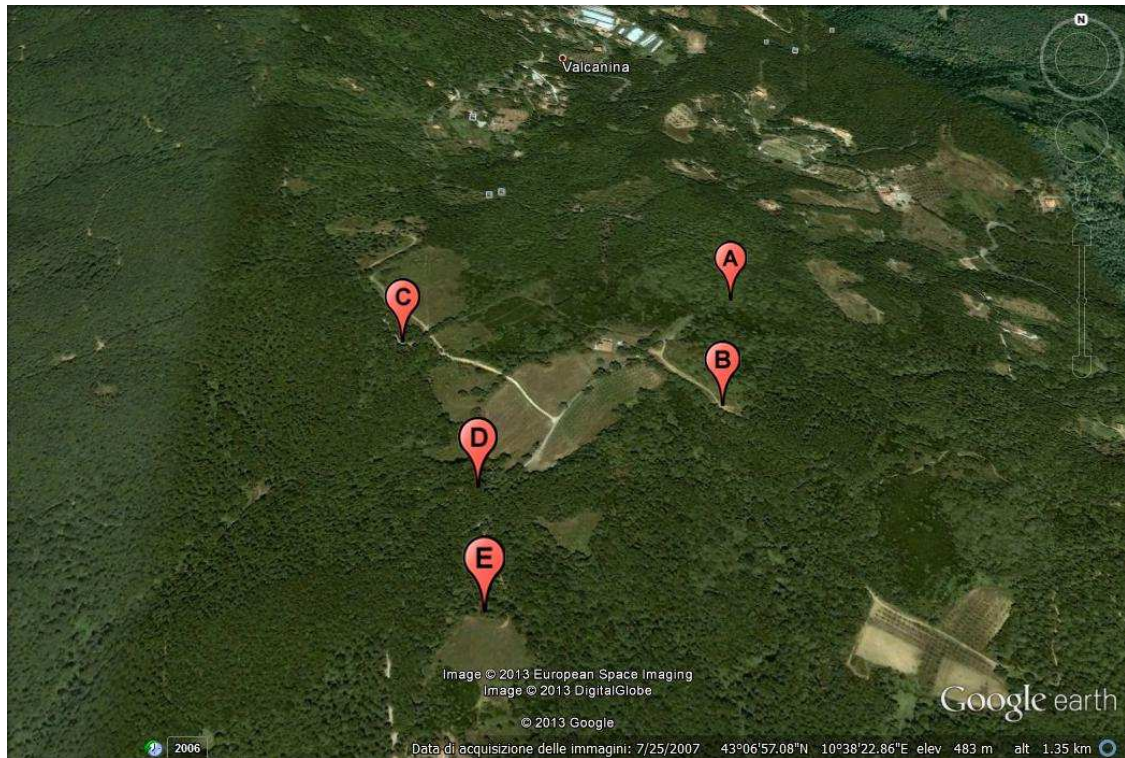


Figura 6. Ubicazione delle 5 stazioni in studio, in cui si apprezza la copertura della vegetazione nell'area (da *Google Earth*, modificato).

Le varie prove sono state effettuate in maniera omogenea nelle cinque aree.

Gli aspetti caratterizzanti le 5 stazioni in cui sono state effettuate le diverse prove, sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche di ciascuna stazione in cui sono state effettuate le prove. Nelle colonne sono riportate le 5 stazioni, nelle righe gli aspetti che le caratterizzano.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>Specie vegetali a biomassa prevalente</b>	<i>Castanea sativa</i> Mill.	<i>Quercus suber</i> L.	<i>Quercus cerris</i> L.	<i>Quercus cerris</i> L. <i>Quercus ilex</i> L.	<i>Quercus cerris</i> L.
<b>Governo del bosco</b>	ceduo	ceduo	ceduo	ceduo	ceduo
<b>Tipologia suolo prevalente</b>	ampia lettiera; terreno profondo, non compatto	ampia lettiera; terreno profondo, non compatto	ampia lettiera; terreno profondo, non compatto	roccia affiorante	terreno profondo, compatto
<b>Altitudine</b>	470 m s.l.m.	465 m s.l.m.	495 m s.l.m.	482 m s.l.m.	490 m s.l.m.
<b>Esposizione</b>	S/E	S S/E	S S/W	N	nessuna esposizione

Tali stazioni presentano caratteri molto simili tra loro. Tutte hanno una tipologia vegetazionale costituita da bosco ceduo, ossia un bosco che viene tagliato periodicamente, di solito ogni 10-30 anni, e che si rigenera prevalentemente per via vegetativa (Bernetti, 2005); le condizioni edafiche e microclimatiche, quindi, non risultano sempre costanti nel tempo. La stazione D è l'unica che presenta alcuni caratteri diversi dalle altre: l'esposizione per questa stazione risulta verso nord, questo potrebbe comportare la presenza di un microclima particolare, con una minore insolazione e una temperatura più bassa rispetto alle altre stazioni; inoltre la tipologia di suolo prevalente nella stazione D è costituito da roccia affiorante, mentre nelle altre stazioni la lettiera è ampia, il terreno si presenta profondo e non compatto, tranne che nella stazione E, la più simile alla D, poiché il terreno si presenta compatto e la lettiera risulta scarsa.

Sopralluoghi per accertarsi della presenza e della sufficiente densità della popolazione nell'area di studio, sono stati effettuati nei mesi di gennaio e febbraio 2013.



## 2.2. Prove di impollinazione

Innanzitutto sono state prodotte alcune strutture, dette “cappucci”, costituite da un’intelaiatura di fil di ferro avvolta da uno strato di tessuto non tessuto (Figura 7). Tali strutture sono state utilizzate per racchiudere la pianta su cui è stata effettuata un’impollinazione forzata, al fine di escludere potenziali insetti impollinatori.



Figura 7. Cappuccio posizionato *in loco* su una pianta trattata; il cartellino riporta la sigla corrispondente al trattamento effettuato. Le sigle e il loro significato sono descritti in questo capitolo.

Figura 8. Alcuni cappucci *in loco*, in località Sassetta.

La lunghezza dello stilo determina l’altezza dello stigma in relazione alle antere. Data la variabilità dell’altezza dello stigma in questa specie (Peruzzi & Carta, 2011), nelle prove effettuate gli individui sono stati suddivisi in Short e Long riguardo tale altezza. Sono stati considerati come Short gli individui in cui lo stigma si trovava in una posizione abbastanza bassa da poter toccare le antere o appena sopra di esse, fino ad una altezza massima di circa 2 mm sopra le antere; sono stati considerati Long invece gli individui

con stigma situato al di sopra delle antere da un'altezza di almeno 2 mm in poi, e di conseguenza in cui il contatto spontaneo tra i due organi è stato considerato difficoltoso.

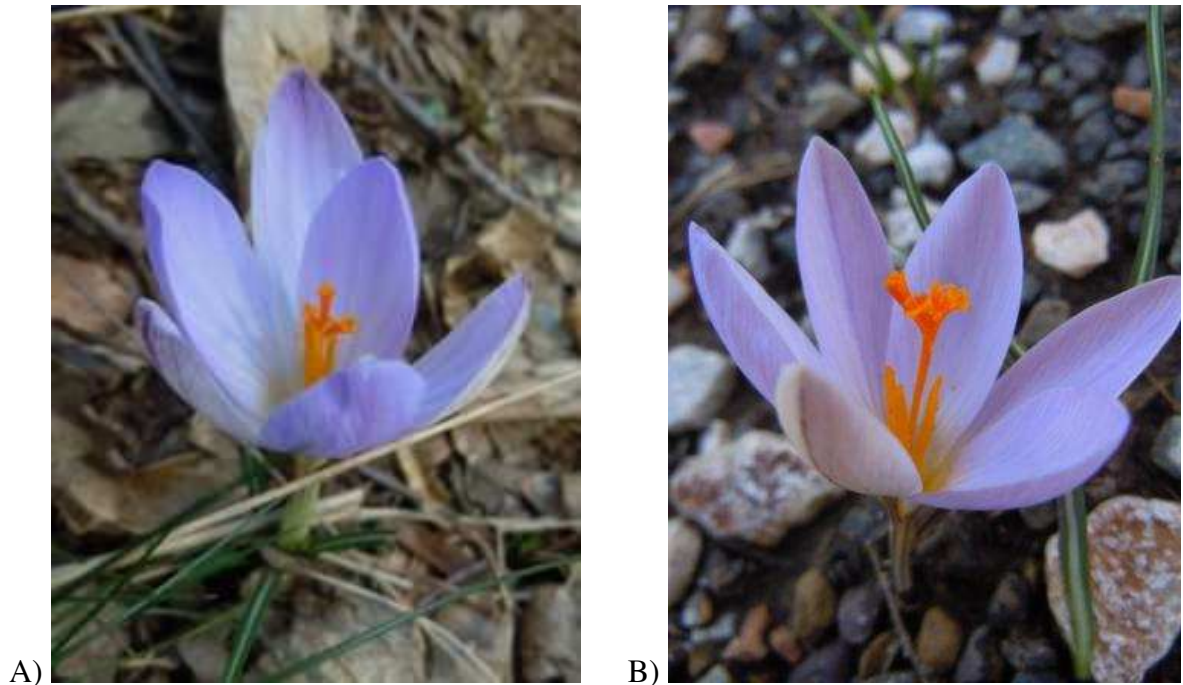


Figura 9. A) Individuo brevistilo; B) Individuo longistilo.

Per comodità, nel testo ci si riferisce alle due tipologie di altezza dello stigma Short e Long utilizzando il termine “morfo”.

All'inizio del mese di marzo 2013 sono state effettuate le prove di impollinazione su alcuni individui della popolazione. Per ciascuna tipologia di prova sono state effettuate 20 repliche. Le prove nel dettaglio sono state:

- SAS (Spontaneous Autogamy Short-styled flowers)

Fiori a stilo corto sono stati incappucciati, senza manipolare la parte fiorale.

- SAL (Spontaneous Autogamy Long-styled flowers)

Fiori a stilo lungo sono stati incappucciati, senza manipolare la parte fiorale.

- FAS (Facilitated Autogamy Short-styled flowers)

Fiori a stilo corto sono stati emasculati e le antere sono state strofinate sullo stigma della stessa pianta, poi la pianta è stata incappucciata.

- FAL (Facilitated Autogamy Long-styled flowers)

Fiori a stilo lungo sono stati emasculati e le antere sono state strofinate sullo stigma della stessa pianta, poi la pianta è stata incappucciata.

- CLL (Cross pollination Long-styled flowers on Long-styled flowers)

Le antere di più fiori a stilo lungo (da 3 a 5, prelevati ad una distanza di almeno 3 metri dall'individuo ricevente) sono state strofinate sullo stigma di una pianta con fiori a stilo lungo (diversa da quelle da cui provengono le antere), che è stata precedentemente emasculata. Poi la pianta è stata incappucciata.

- CSS (Cross pollination Short-styled flowers on Short-styled flowers)

Le antere di più fiori a stilo corto (da 3 a 5, prelevati ad una distanza di almeno 3 metri dall'individuo ricevente) sono state strofinate sullo stigma di una pianta con fiori a stilo corto (diversa da quelle da cui provengono le antere), che è stata precedentemente emasculata. Poi la pianta è stata incappucciata.

- CLS (Cross pollination Long-styled flowers on Short-styled flowers)

Le antere di più fiori a stilo lungo (da 3 a 5, prelevati ad una distanza di almeno 3 metri dall'individuo ricevente) sono state strofinate sullo stigma di una pianta con fiori a stilo corto (diversa da quelle da cui provengono le antere), che è stata precedentemente emasculata. Poi la pianta è stata incappucciata.

- CSL (Cross pollination Short-styled flowers on Long-styled flowers)

Le antere di più fiori a stilo corto (da 3 a 5, prelevati ad una distanza di almeno 3 metri dall'individuo ricevente) sono state strofinate sullo stigma di una pianta con fiori a stilo lungo (diversa da quelle da cui provengono le antere), che è stata precedentemente emasculata. Poi la pianta è stata incappucciata.



- APO (Apomixis)

I fiori (senza selezione in base alla lunghezza dello stilo) sono stati emasculati, successivamente la pianta è stata incappucciata.

Inoltre sono stati selezionati casualmente circa 60 individui fioriti (10-15 per ciascuna stazione), sui quali non sono state effettuate manipolazioni fiorali, ma è stata misurata la distanza tra l'apice dello stigma e la parte centrale delle antere. I fiori sono stati poi marcati con un cartellino su cui è stato riportato tale valore, e la loro maturazione è proceduta in condizioni naturali. Questi individui, oltre a fornire dati sulla misura della distanza tra stigma e antere presente nella popolazione, svolgono anche la funzione di controlli.



Figura 10. Un individuo di controllo marcato con cartellino giallo che riporta la misura della distanza stigma-antere dello stesso.

I trattamenti di autogamia spontanea, forzata e incrocio sono stati ripresi da Navarro & al., 2012. Una sintesi di tutte le prove effettuate è presente in Tabella 2.

Tabella 2. Le varie tipologie di impollinazione effettuate e la categoria generale a cui appartengono. Accanto a ciascuna prova tra parentesi, il numero di individui presi in esame.

Autogamia ( <i>Self</i> )	Incrocio ( <i>Cross</i> )	Apomissia	Controllo
<ul style="list-style-type: none"> <li>- SAS (20)</li> <li>- SAL (20)</li> <li>- FAS (20)</li> <li>- FAL (20)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CLL (20)</li> <li>- CSS (20)</li> <li>- CLS (20)</li> <li>- CSL (20)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- APO (20)</li> </ul>	<p>gli individui su cui è stata misurata distanza stigma-antere, non manipolati (60)</p>

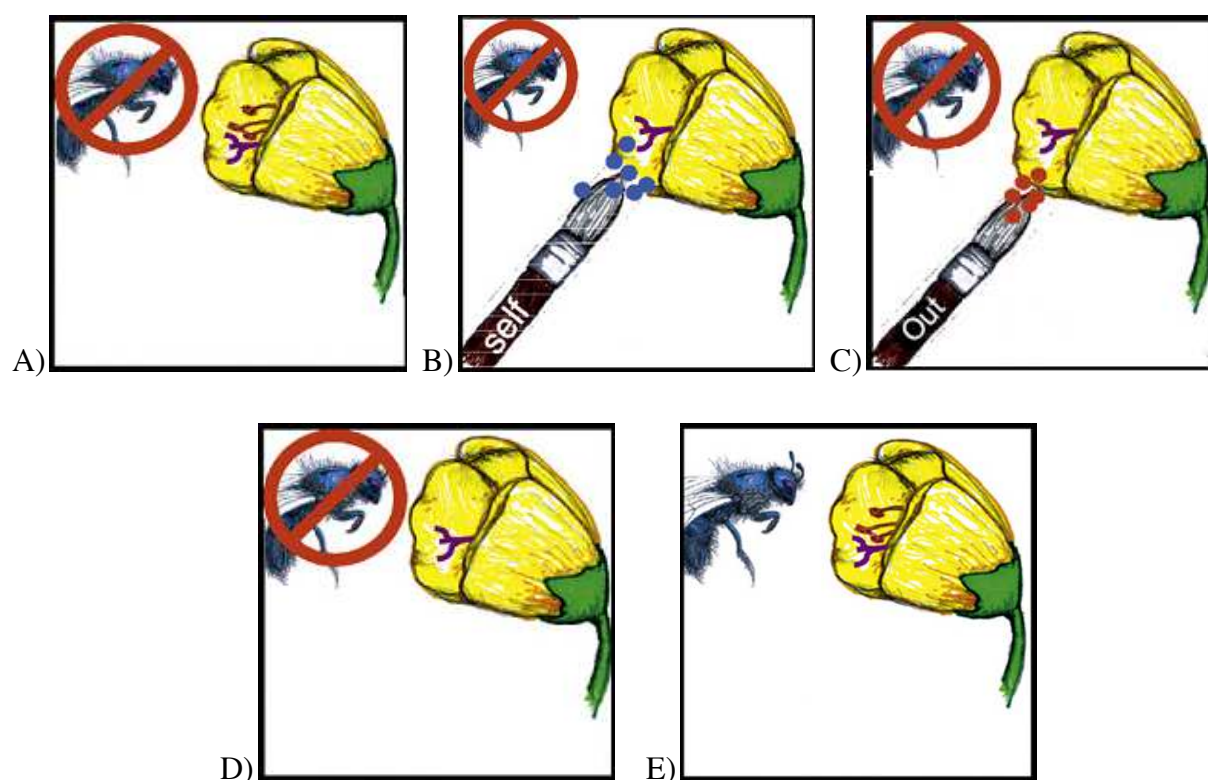


Figura 11. Le varie tipologie di prove di impollinazione (non è considerata la distinzione tra i morfi Short e Long): A) SAS e SAL; B) FAS e FAL; C) CLL, CSS, CLS, CSL; D) Apomissia E) Controllo.

I fiori sono stati distinti in base allo stadio fenologico a cui appartenevano, e per le prove sono stati scelti solo individui per i quali, dopo attenta osservazione, si potesse supporre uno stadio iniziale di fioritura, e perciò anche che non avessero ancora ricevuto polline dall'esterno. Sono stati quindi selezionati fiori che possedevano antere mature

ma polline non disperso, e stigmi ricettivi. Inoltre è stato verificato che ciascun individuo utilizzato per le prove non stesse producendo più di un fiore.

### **2.3. Calcolo di *fruit set* e *seed set***

Alla fine del mese di aprile 2013 la maturazione delle capsule era completa, quindi si è proceduto con la rimozione dei cappucci e la raccolta dei frutti.



Figura 12. Individuo con frutto in fase di maturazione.

I frutti raccolti sono stati posti in sacchetti di carta, separati sia per trattamento sia per località.

Il lavoro di pulitura e conteggio dei frutti e semi è iniziato dopo qualche giorno, per permettere al materiale di completare la maturazione.

Con i frutti provenienti dai vari trattamenti si è proceduto con il calcolo del *fruit set*, definito come la percentuale del rapporto tra numero di piante che hanno prodotto frutto e il numero totale di piante manipolate, per ciascun trattamento. Poi, sempre mantenendo tutti i frutti separati, questi sono stati ripuliti, aperti, i semi sono stati contati

e si è calcolato il *seed set*, ovvero la percentuale del rapporto tra il numero medio di semi ben formati, e il numero medio totale di semi e ovuli (semi ben formati + semi vuoti + semi abortiti + ovuli non fecondati) per i frutti di ciascun trattamento (Baker & al., 2000b).

Con i frutti provenienti dai controlli è stato calcolato il *fruit set* e il *seed set* per poter studiare la relazione tra la distanza stigma-antere, che era stata misurata in campo per questi individui, e il numero di semi prodotti.

Per il calcolo del *seed set* abbiamo incluso nel conteggio dei semi ben formati quelli che si mostravano sia globosi sia leggermente raggrinziti e presentavano internamente l'embrione; gli altri, con un aspetto collassato, spesso molto raggrinziti e appiattiti, non globosi, vuoti e privi di embrione, sono stati esclusi dal conteggio dei semi ben formati.

Il conteggio del *seed set* è stato effettuato tre volte per ciascun trattamento e per i controlli, in modo da essere certi del risultato ottenuto.

## **2.4. Misurazioni della massa dei semi**

Le misurazioni della massa dei semi provenienti dalle varie prove, a causa della scarsità del materiale, sono state effettuate ignorando la suddivisione per stazione, e mantenendo solo quella per trattamento. Per ogni trattamento sono state eseguite 5 repliche, ciascuna con un numero di semi variabile da 10 a 20.

Le misurazioni della massa dei semi provenienti dagli individui di controllo hanno permesso di mettere in rapporto la distanza tra stilo e antere che era stata rilevata, con la massa media dei semi prodotti, per ciascun individuo. E' stata misurata la massa media dei semi di ogni frutto, mantenendo la suddivisione per stazione. Sono stati pesati i semi di 57 frutti, ciascun frutto conteneva un numero di semi variabile da 7 a 35.

Le misurazioni di massa sono state effettuate con bilancia analitica digitale.

## 2.5. Analisi statistiche

Al fine di valutare la significatività dei risultati, sono state svolte analisi statistiche attraverso alcuni test e indici comunemente utilizzati.

I risultati di *fruit set* e *seed set* sono stati analizzati utilizzando la regressione logistica (Baker & al., 2000b), un modello di regressione non lineare applicato a casi in cui la variabile dipendente  $y$  sia di tipo binomiale e che quindi assuma i valori 0 o 1 (Hosmer & al., 2013). Sia *fruit set* che *seed set* si possono considerare come variabili binomiali: presenza/assenza di frutto prodotto in ciascun trattamento per il *fruit set*; presenza/assenza di seme, in ciascun frutto prodotto nei vari trattamenti per il *seed set*.

Per testare la normalità della distribuzione della distanza stigma-antere nella popolazione, rappresentata dagli individui di controllo, è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965), considerato uno dei test più potenti per la verifica della normalità soprattutto per piccoli campioni; vengono confrontati due stimatori alternativi della varianza, uno non parametrico al numeratore, e uno parametrico (la varianza campionaria) al denominatore.  $W$  può assumere valori da 0 a 1, estremi che corrispondono rispettivamente al rifiuto e all'accettazione dell'ipotesi di normalità; tuttavia  $W$  è fortemente asimmetrico e valori apparentemente elevati possono portare ugualmente al rifiuto dell'ipotesi di normalità (Cesana & al., 2012).

Per testare la presenza o assenza di correlazione tra la distanza stigma-antere misurata negli individui di controllo e il *seed set*, è stato utilizzato il coefficiente di correlazione di Spearman, che è una misura statistica non parametrica della correlazione tra due variabili, per le quali si ipotizza la misura ordinale e continua; viene indicato con la lettera greca  $\rho$  (rho) e se positivo (tra 0 e +1) indica che le due variabili sono direttamente proporzionali tra loro, se negativo (tra 0 e -1) indica che sono inversamente proporzionali (Dowdy & Wearden, 1983).

Per le misurazioni della massa dei semi prodotti sia dai trattamenti sia dai controlli, i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il test ANOVA (ANalysis Of VAriance), che permette di confrontare i vari gruppi di dati comparando la variabilità presente all'interno dei gruppi con la variabilità tra i gruppi (Zani, 1994).

Il test di Tukey, effettuato sulla massa media dei semi dei vari trattamenti e dei controlli, è un test Post Hoc, non parametrico e viene utilizzato nel caso in cui l'ANOVA risulti significativa; questo test permette di effettuare un numero qualsiasi di confronti tra coppie di trattamenti, ed è utilizzato per verificare se uno dei due gruppi a confronto tende ad allontanarsi da posizioni moderate della scala ordinale (Siegel & Tukey, 1960). I risultati del test di Tukey sono resi evidenti con il metodo denominato Compact Letter Display, il quale utilizza le lettere per mostrare le differenze significative fra trattamenti: lettere uguali indicano differenze non significative, lettere diverse differenze significative.

Sono stati inoltre utilizzati alcuni tipi di indici che permettono di testare il livello di autocompatibilità della specie. Questi sono:

- *Self-Compatibility Index* (SCI) (Lloyd & Schoen, 1992). Utilizza il *seed set* per testare il livello di autocompatibilità della specie; può assumere valori da 0 (autoincompatibilità totale) a 1 (autocompatibilità totale) (Petanidou & al., 2012).

$$SCI = (\text{seed set medio dopo autoimpollinazione manuale}) / (\text{seed set medio dopo impollinazione incrociata manuale}).$$

- *Selfing Rate* (S) (Charlesworth & Charlesworth, 1987), stima la frequenza di autoimpollinazione anch'esso utilizzando come dato il *seed set*; più si avvicina a 0, maggiore è il livello di autoincompatibilità della specie.

$$S = (P_X - P_0) / (P_X - P_S);$$

$P_X$  = *seed set* dopo impollinazione incrociata manuale,

$P_S$  = *seed set* dopo autoimpollinazione manuale,

$P_0$  = *seed set* controlli.

- *Self-Incompatibility Index* (ISI) (Zapata & Arroyo, 1978), misura il livello di autoincompatibilità di una specie, utilizzando il *fruit set*. Quando vale 1 indica autocompatibilità totale, quando vale 0 totale autoincompatibilità.

$$ISI = (\text{fruit set dopo autoimpollinazione manuale}) / (\text{fruit set dopo impollinazione incrociata manuale}).$$

### 3. RISULTATI

Per quanto riguarda l'attività di impollinazione manuale *in situ*, durante l'operazione di smantellamento dei cappucci e prelievo di frutti e semi alcuni dei cappucci che erano stati posti *in loco* sono stati ritrovati danneggiati, in posizioni diverse rispetto a dove erano stati posti, o sono andati perduti. Questo ha portato conseguentemente a una diminuzione del numero di individui presi in studio; la perdita ha coinvolto circa 10 cappucci in totale, quindi non è risultata cospicua ed ha permesso comunque di ottenere un numero di frutti e semi sufficiente per proseguire lo studio.

#### 3.1. *Fruit set e seed set*

Le Figure 13 e 14 riportano i valori di *fruit set %* e *seed set %*, calcolati per i controlli e per tutti i trattamenti. Le Tabelle 3 e 4 mostrano i risultati della regressione logistica rispettivamente per il *fruit set* e il *seed set*; l'analisi illustra la significatività di ciascun trattamento rispetto al controllo, preso come riferimento.

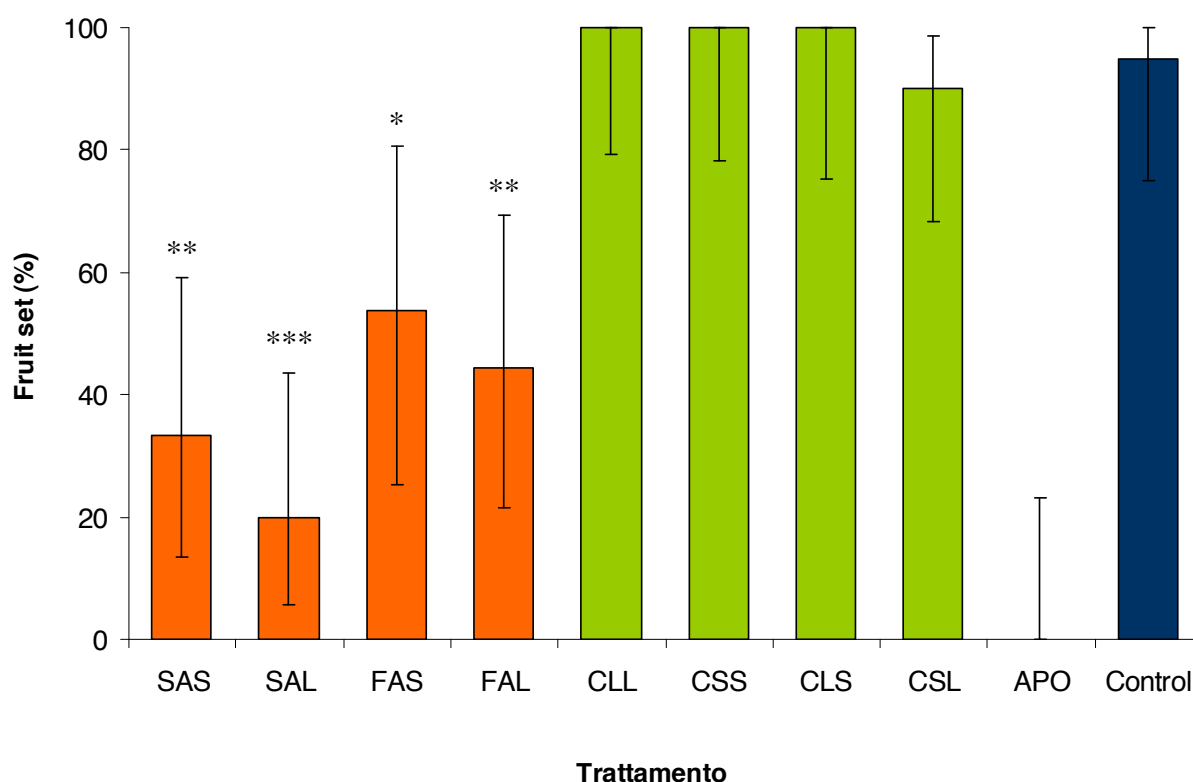


Figura 13. *Fruit set*. Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza binomiale. Per il significato degli asterischi, fare riferimento alla didascalia di Tabella 3. N (individui misurati): 18 (SAS); 20 (SAL); 13 (FAS); 18 (FAL); 16 (CLL); 15 (CSS); 13 (CLS); 20 (CSL); 14 (APO); 20 (Control). SAS = Spontaneous Autogamy Short-styled flowers, SAL = Spontaneous Autogamy Long-styled flowers, FAS = Facilitated Autogamy Short-styled flowers, FAL = Facilitated Autogamy Long-styled flowers, CLL = Cross pollination Long-styled flowers on Long-styled flowers, CSS = Cross pollination Short-styled flowers on Short-styled flowers, CLS = Cross pollination Long-styled flowers on Short-styled flowers, CSL = Cross pollination Short-styled flowers on Long-styled flowers, APO = Apomixis.



Tabella 3. Risultati della regressione logistica sul *fruit set*, di ogni trattamento rispetto al controllo;  $\pm$  95% intervallo di confidenza binomiale. P = probabilità dell'ipotesi nulla. L'asterisco indica il grado di significatività (\* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ ). Per il significato delle sigle dei trattamenti, fare riferimento alla didascalia di Figura 13.

Trattamento	Coefficiente	P ( $> Z $ )
SAS	-3.638	0.0014 **
SAL	-4.331	0.0002 ***
FAS	-2.79	0.0168 *
FAL	-3.168	0.0051 **
CLL	23.599	0.9998
CSS	23.54	0.9998
CLS	23.409	0.9998
CSL	-0.747	0.5557

L'effetto dei trattamenti di autogamia è significativo, mentre non lo è molto l'effetto dei trattamenti di incrocio rispetto al controllo. I 4 trattamenti autogami risultano quindi diversi dal controllo (in particolare il trattamento SAL, il quale possiede anche un alto valore del coefficiente, che dimostra che l'effetto di questo trattamento è molto forte e molto significativo).

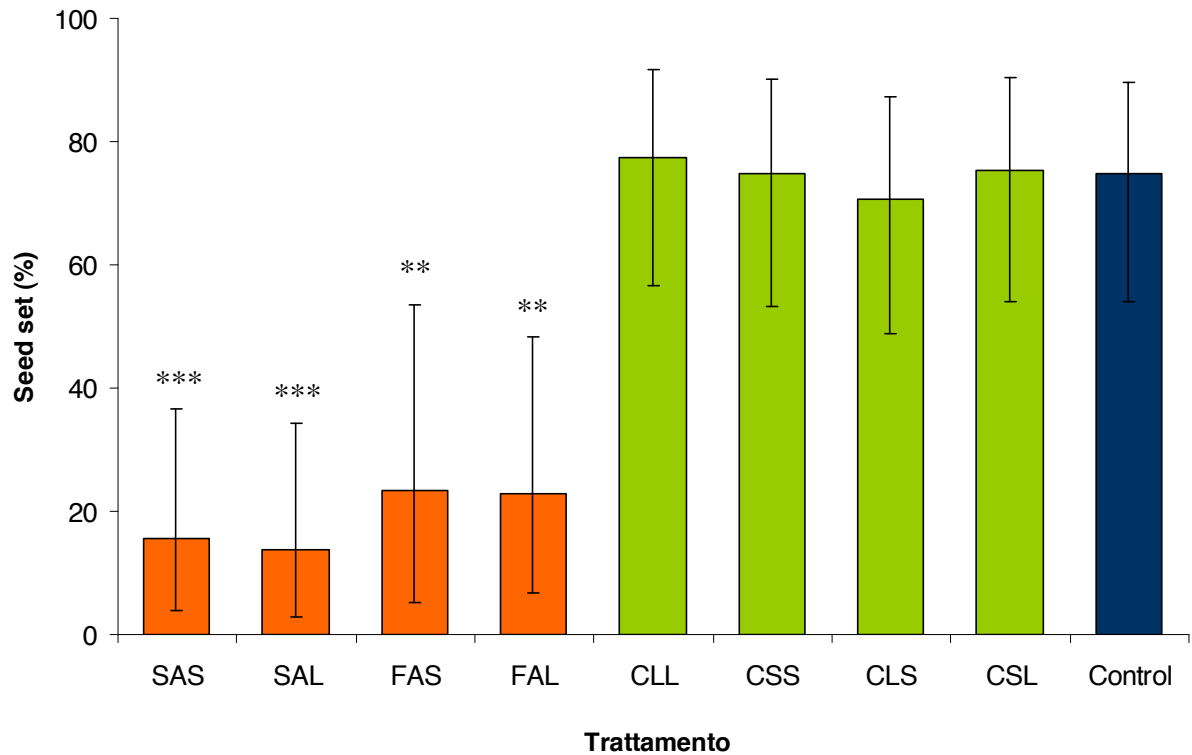


Figura 14. *Seed set*. Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza binomiale. Per il significato degli asterischi, fare riferimento alla didascalia di Tabella 4. N (individui misurati): 6 (SAS); 4 (SAL); 7 (FAS); 8 (FAL); 16 (CLL); 15 (CSS); 13 (CLS); 18 (CSL); 57 (Control). SAS = Spontaneous Autogamy Short-styled flowers, SAL = Spontaneous Autogamy Long-styled flowers, FAS = Facilitated Autogamy Short-styled flowers, FAL = Facilitated Autogamy Long-styled flowers, CLL = Cross pollination Long-styled flowers on Long-styled flowers, CSS = Cross pollination Short-styled flowers on Short-styled flowers, CLS = Cross pollination Long-styled flowers on Short-styled flowers, CSL = Cross pollination Short-styled flowers on Long-styled flowers.

Tabella 4. Risultati della regressione logistica sul *seed set*, di ogni trattamento rispetto al controllo;  $\pm 95\%$  intervallo di confidenza binomiale. P = probabilità dell'ipotesi nulla. L'asterisco indica il grado di significatività (\* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ ). Per il significato delle sigle dei trattamenti, fare riferimento alla didascalia di Figura 14.

Trattamento	Coefficiente	P ( $> Z $ )
SAS	-2.772	0.0001 ***
SAL	-2.926	9.11e-05 ***
FAS	-2.265	0.0034 **
FAL	-2.302	0.0012 **
CLL	0.153	0.8138
CSS	0.004	0.9954
CLS	-0.204	0.7466
CSL	0.039	0.9517

Anche nel caso del *seed set* l'effetto dei 4 trattamenti di autogamia risulta molto significativo (in particolar modo SAS e SAL) mentre non risultano molto significativi i 4 trattamenti di incrocio rispetto al controllo.

Il trattamento SAL risulta, tra tutti i trattamenti *self*, il più significativamente diverso rispetto ai controlli, sia per quanto riguarda il *fruit set* sia il *seed set*.

La differenza tra i 4 trattamenti autogami e i 4 trattamenti di incrocio è molto marcata, mentre i controlli hanno un andamento simile ai *cross*, in entrambi i grafici. Per quanto riguarda i 4 trattamenti autogami, nei FAS e FAL la percentuale di *fruit set* e anche di *seed set* risulta più alta rispetto a SAS e SAL; nel *fruit set* in media, gli individui S hanno prodotto molti più frutti degli L, tra gli autogami. Tutti gli incroci hanno prodotto un alto numero di frutti e di semi ben formati, così come i controlli.

### 3.2. Distanza stigma-antere

Alcune misurazioni di altezza di stigma e antere sono state effettuate anche nell'anno 2012 su individui situati a Sassetta nelle stesse località indagate nell'anno 2013. Le misurazioni sono riportate in Figura 15.

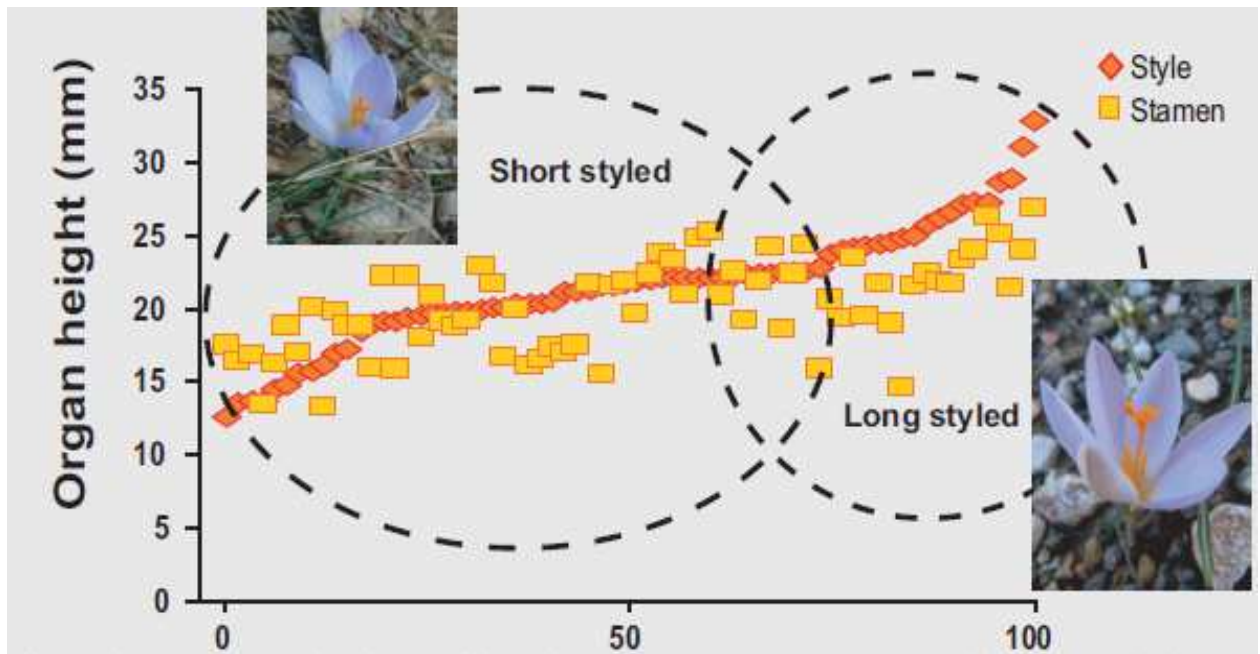


Figura 15. Altezza di stigma e antere in individui di controllo misurati nell'anno 2012.

Come è possibile osservare dalla Figura 15, l'altezza delle antere risulta simile in tutti gli individui; l'altezza dello stigma invece varia, in modo continuativo, da più in basso a più in alto rispetto alle antere.

Per quanto riguarda le misurazioni effettuate nell'anno 2013 sugli individui di controllo, il valore medio della distanza stigma-antere di tutte le stazioni risulta essere  $2.99 \pm 2.43$  mm; questo valore risulta approssimativamente a metà tra fiori con stigma molto alto e fiori con altezza dello stigma minore. La distanza stigma-antere negli individui di controllo segue una distribuzione normale (Figura 16), in base al risultato del test di Shapiro-Wilk ( $W = 0.988$ ;  $P \text{ value} = 0.845$ ).

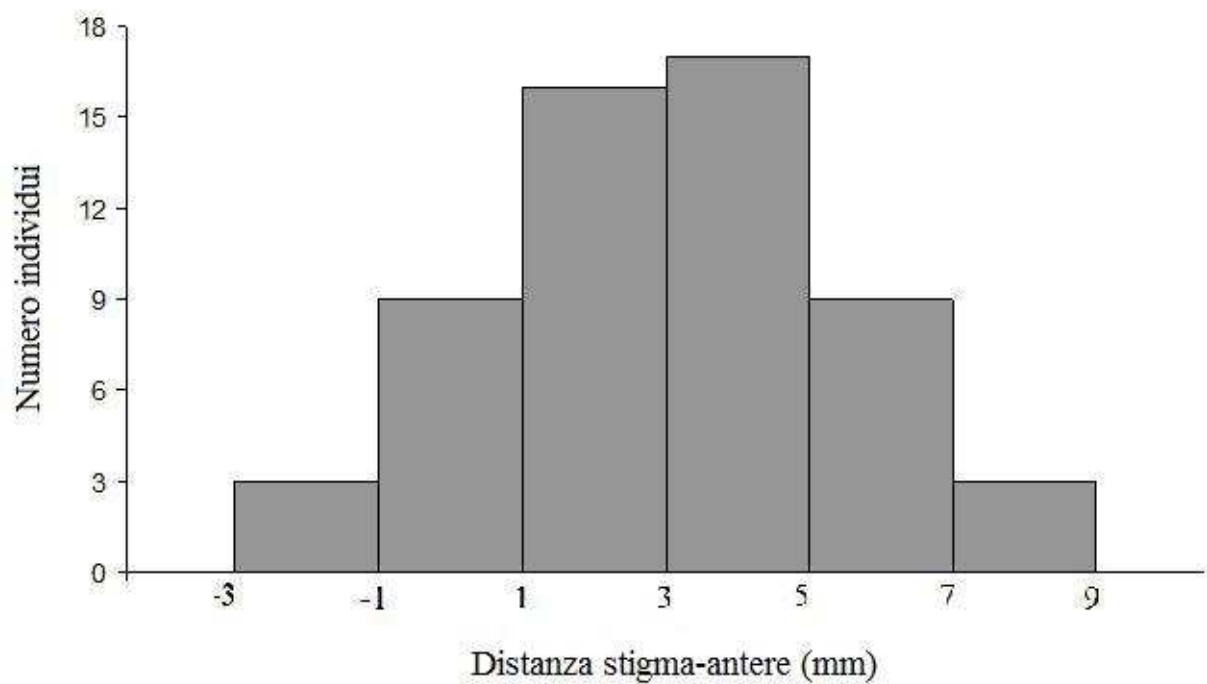


Figura 16. Distribuzione della distanza stigma-antere di tutti gli individui di controllo, suddivisa in classi di 2 mm di ampiezza. N (individui misurati): 57.

La Figura 17 riporta la relazione tra la distanza stigma-antere e il *seed set* per gli individui di controllo.

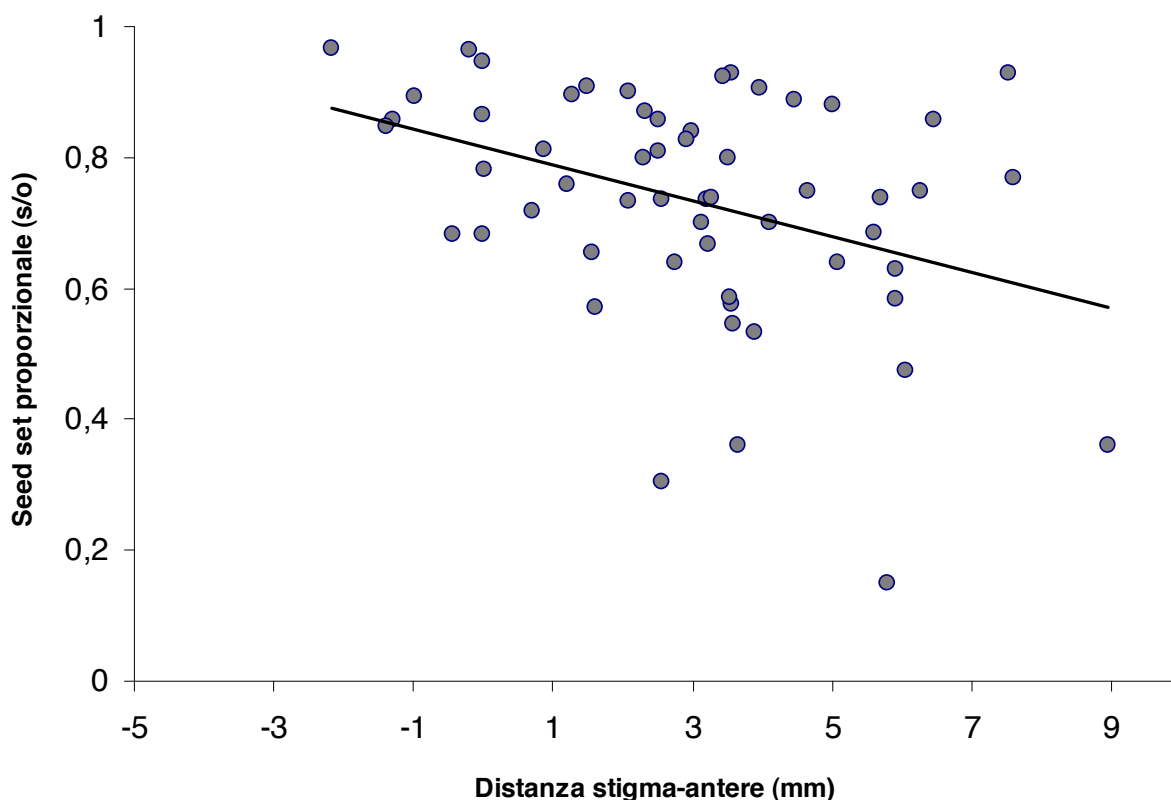


Figura 17. *Seed set* in funzione della distanza stigma-antere, per ciascun individuo di controllo. Il segmento rappresenta la linea di tendenza dei punti. N (individui misurati): 57.

Dalla linea di tendenza dei punti si osserva che all'aumentare della distanza tra stigma e antere diminuisce il *seed set*, quindi gli individui che presentano una distanza stigma-antere più piccola producono un maggior numero di semi. Inoltre, i punti risultano più raggruppati su distanze stigma-antere minori, mentre si allargano man mano che questa distanza aumenta. Il test di Spearman effettuato afferma che la distanza stigma-antere e la quantità di semi prodotti sono due grandezze inversamente proporzionali ( $\rho = -0.354$ ), e risultano fortemente correlate ( $P = 0.007$ ).

Per quanto riguarda la distanza stigma-antere, sono stati confrontati gli individui di controllo di tutte le stazioni, tramite un grafico di tipo Boxplot (Figura 18).

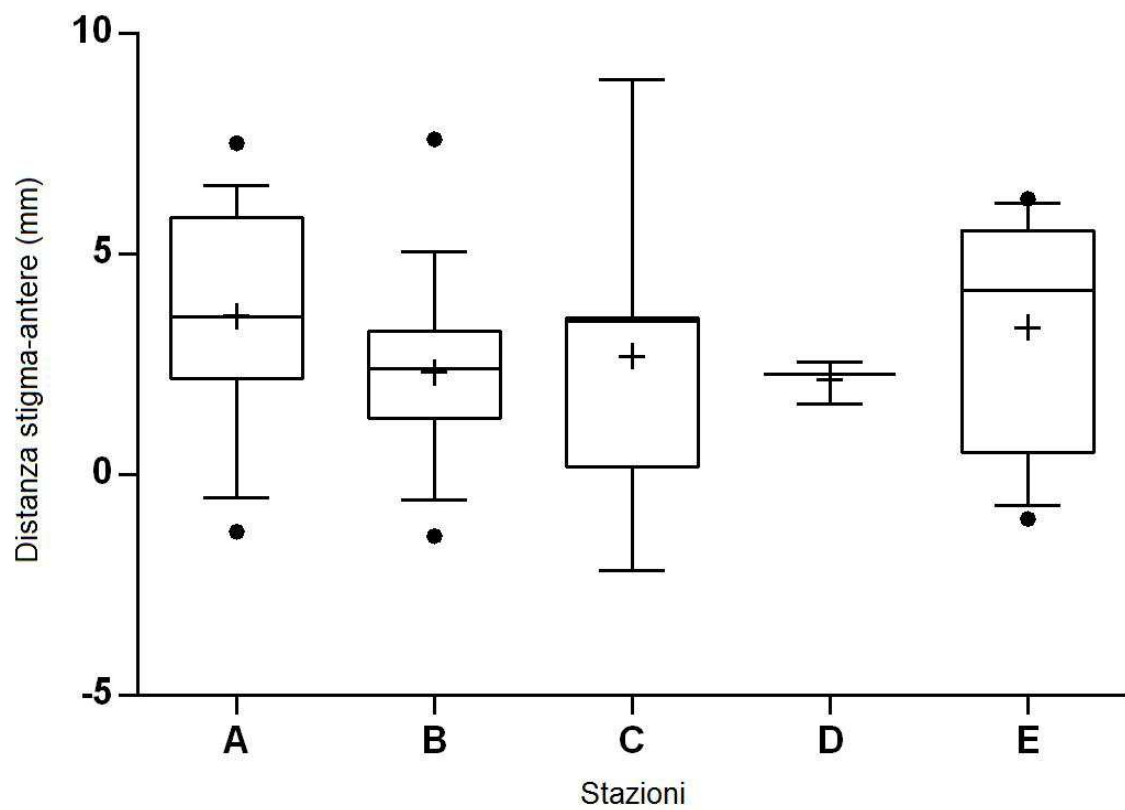


Figura 18. Distanza stigma-antere. I segni + rappresentano la posizione del valore medio, i cerchi gli *outliers*. N (individui misurati): 17 (A); 17 (B); 8 (C); 3 (D); 12 (E).

Dal grafico si osserva che la variabilità della stazione D risulta la più bassa, mentre la più alta è quella della stazione C.

### 3.3. Massa semi

Nella Figura 19 sono riportati i valori di massa media dei semi per tutti i trattamenti e per i controlli.

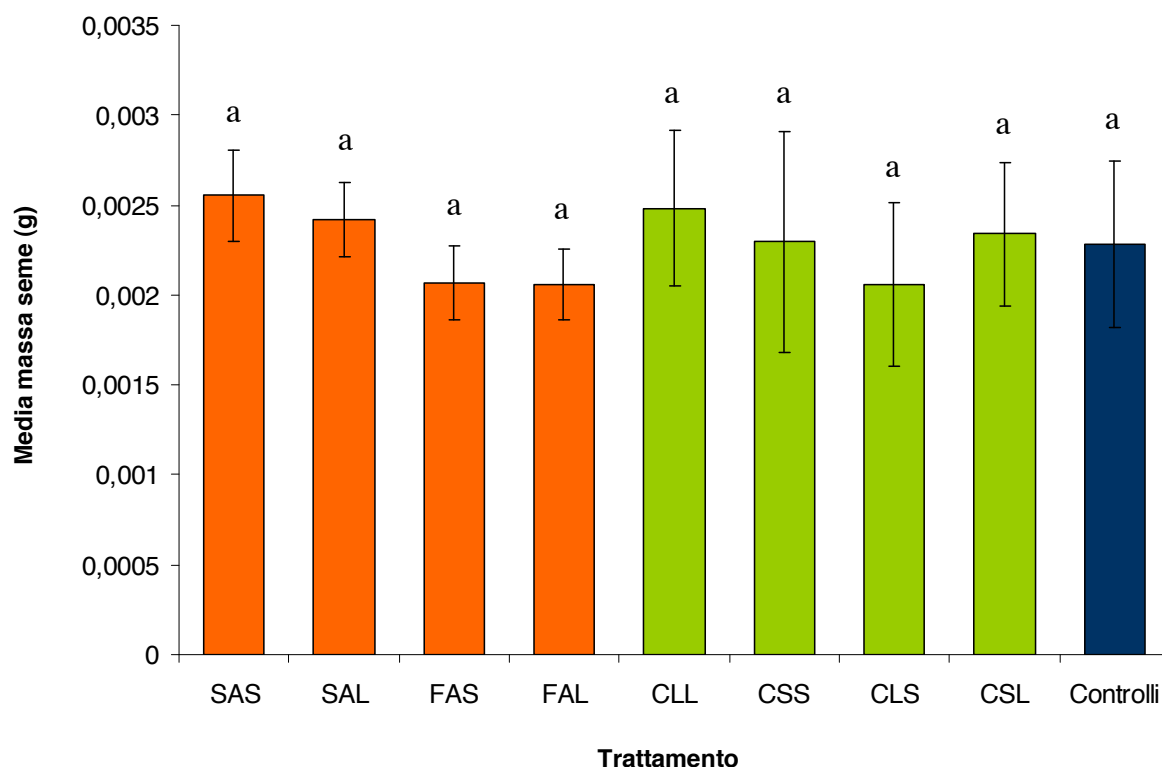


Figura 19. Massa media dei semi. Le barre rappresentano la deviazione standard della media. Le lettere presenti sopra le barre rappresentano il risultato del test di Tukey effettuato tra i vari trattamenti; lettere uguali denotano differenze non significative. N (individui misurati): 3 (SAS); 2 (SAL); 5 (FAS); 2 (FAL); 5 (CLL); 5 (CSS); 5 (CLS); 5 (CSL); 57 (Control). SAS = Spontaneous Autogamy Short-styled flowers, SAL = Spontaneous Autogamy Long-styled flowers, FAS = Facilitated Autogamy Short-styled flowers, FAL = Facilitated Autogamy Long-styled flowers, CLL = Cross pollination Long-styled flowers on Long-styled flowers, CSS = Cross pollination Short-styled flowers on Short-styled flowers, CLS = Cross pollination Long-styled flowers on Short-styled flowers, CSL = Cross pollination Short-styled flowers on Long-styled flowers.

Dopo aver effettuato un'analisi statistica della massa dei semi dei vari trattamenti, utilizzando il test ANOVA, non sono state riscontrate differenze significative tra i due morfi Short e Long in cui sono stati suddivisi i trattamenti. Quindi, è stato effettuato un raggruppamento dei trattamenti nelle 4 tipologie principali: SA (Spontaneous Autogamy), FA (Facilitated Autogamy), *cross*, controlli. In questo caso, il test ANOVA



risulta appena significativo ( $F$  value = 2.819;  $P$  = 0.043); inoltre utilizzando il test di Tukey per confronti a coppie, si apprezza una differenza leggermente significativa tra i semi dei vari trattamenti, soprattutto tra i FA ed i controlli ( $t$  value = -2.635;  $P$  = 0.045).

Nella Figura 20 è mostrata la massa dei semi dei controlli in funzione della distanza stigma-antere per ogni stazione.

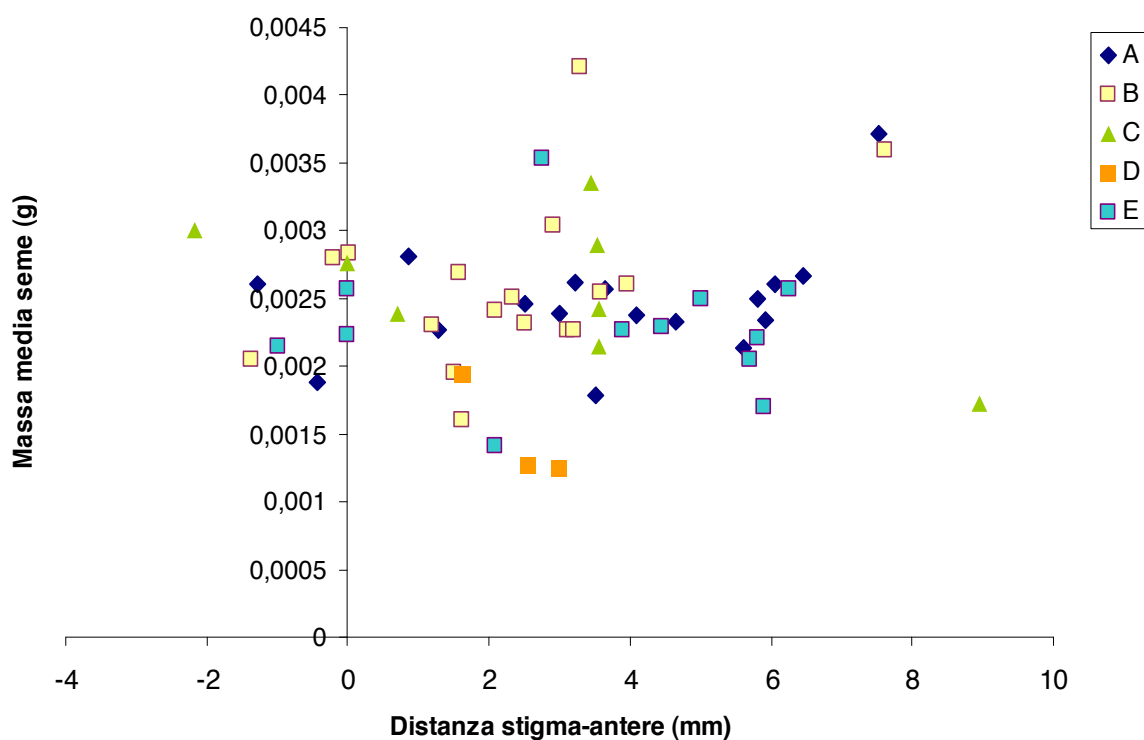


Figura 20. Valore medio della massa dei semi in funzione della distanza stigma-antere, per ciascun individuo di controllo. È evidenziata la suddivisione nelle varie stazioni di provenienza di ciascun individuo. N (individui misurati): 17 (A); 17 (B); 8 (C); 3 (D); 12 (E).

La Figura 21, infine, mostra la massa media dei semi degli individui di controllo in ciascuna stazione.

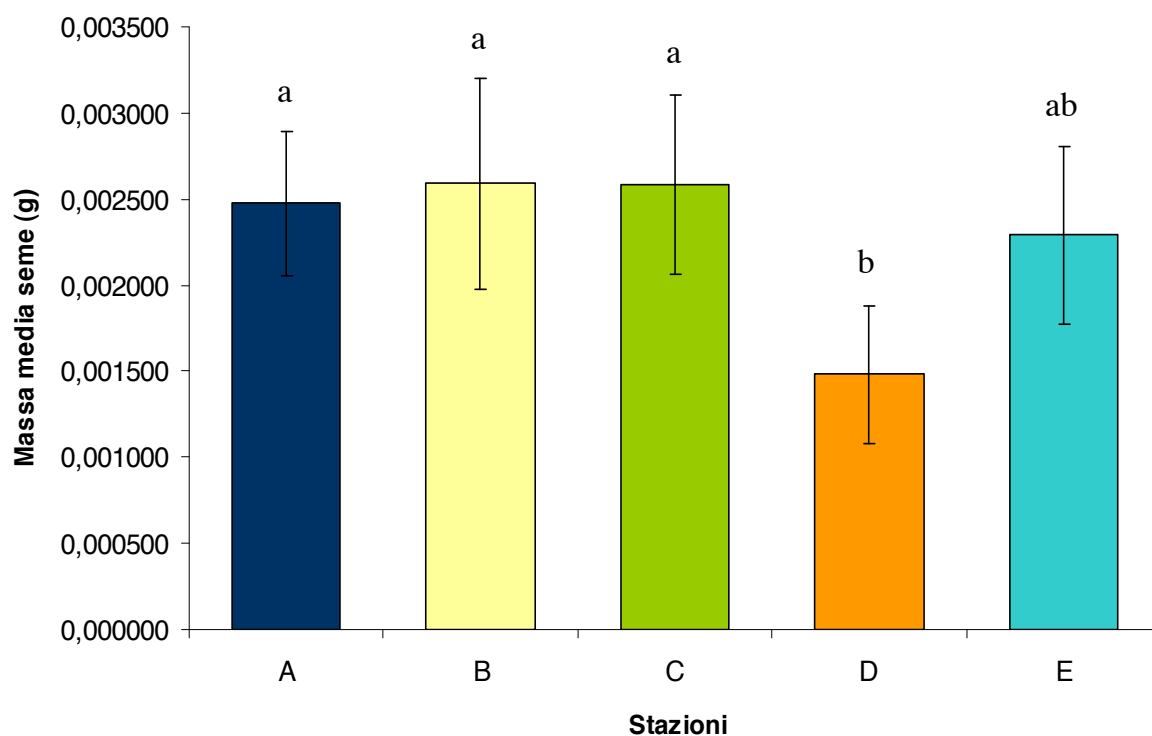


Figura 21. Massa media dei semi degli individui di controllo. Le barre rappresentano la deviazione standard della media. Le lettere presenti sopra le barre rappresentano il risultato del test di Tukey effettuato tra le stazioni; lettere uguali denotano differenze non significative. N (individui misurati): 17 (A); 17 (B); 8 (C); 3 (D); 12 (E).

Si può apprezzare una massa media inferiore nei semi prodotti dagli individui della stazione D, rispetto agli altri quattro siti. Il test ANOVA effettuato su tali dati risulta significativo ( $F \text{ value} = 3.329$ ;  $P = 0.017$ ).

Le differenze tra coppie analizzate utilizzando il test di Tukey sono significative, in particolare quelle con la stazione D, che risulta diversa da tutte le altre ma più simile alla stazione E.

### 3.4. Indici di compatibilità

Per il calcolo degli indici sono stati utilizzati e riuniti i risultati delle varie tipologie di impollinazione sia autogame - di cui sono state considerate solo le tipologie forzate - che di incrocio, riunendo insieme i dati provenienti dai morfi Short e Long. Tale scelta è stata fatta in un secondo tempo, dopo aver notato che le differenze tra i due tipi di morfi erano pressoché assenti. In base ai risultati del test di Tukey, infatti, non esistono differenze significative tra FAS e FAL, né tra i 4 trattamenti di incrocio.

Il *Self-Compatibility Index* (SCI) (Lloyd & Schoen, 1992) risulta 0.3, quindi in base a questo indice la specie è parzialmente autoincompatibile ( $SCI < 0.75$ ).

Il *Selfing Rate* (S) (Charlesworth & Charlesworth, 1987) risulta 0.05, secondo il quale la specie risulta ancora una volta autoincompatibile.

Infine, *Self-Incompatibility Index* (ISI) (Zapata & Arroyo, 1978) risulta 0.44, il che conferma la parziale autoincompatibilità della specie ( $0.150 < ISI < 0.5$ ).

## 4. DISCUSSIONE

### 4.1. *Fruit set e seed set*

Dal *fruit set* e *seed set* si notano alcune particolarità. La somiglianza nell'andamento dei due grafici è alta, il che significa che i trattamenti che hanno prodotto più frutti hanno anche prodotto un più alto numero di semi.

Si può inoltre osservare una differenza significativa, sia nel *fruit set* che nel *seed set*, tra tutti i trattamenti autogami e tutti quelli di incrocio, mentre è alta la somiglianza di tutti i trattamenti di incrocio con i controlli. Questo fatto induce a dedurre che in gran parte gli individui del controllo abbiano probabilmente adottato l'impollinazione incrociata per la produzione di frutti e quindi semi. Questa tesi è rafforzata dalla presenza, nella popolazione in questione, di un'alta densità di individui (Carta & al., 2010), quindi lo scambio di polline tra piante diverse può avvenire facilmente. Tale fatto è una conferma di quanto riscontrato in uno studio precedente effettuato da Carta (2012) sulla stessa specie, in cui non vi è differenza significativa nel *fruit set* e *seed set* tra gli individui sottoposti a impollinazione incrociata ed i controlli, concludendo quindi che la popolazione non risulta affetta da *pollen limitation*.

Per quanto riguarda il *fruit set*, analizzando i due trattamenti autogami forzati, solo la metà circa delle piante ha prodotto frutto rispetto agli incroci. Questo implica l'esistenza di un certo grado di autoincompatibilità nella specie.

Analizzando ancora il *fruit set* e distinguendo tra i due tipi di autogamia - spontanea e forzata - si può osservare che nel trattamento SAL è stato prodotto un numero di frutti inferiore rispetto agli altri 3 trattamenti di autogamia; ciò può essere ragionevolmente spiegato con la difficoltà fisica verso l'autoimpollinazione. Infatti, nella forma Long la distanza tra stigma e antere limita l'autoimpollinazione spontanea. Possiamo altresì affermare che l'autoincompatibilità non è di grado diverso nella forma Short e Long, dato che la differenza nel *fruit set* di FAS e FAL non risulta significativa; inoltre ciò è ancora più evidente nel *seed set*, dove la differenza tra il numero di semi di FAS e FAL non risulta significativamente diversa. Questa è una conferma del fatto che la differenza

di *fitness* presente tra la forma Short e Long nei trattamenti autogami spontanei è dovuta alla diversa morfologia delle due forme e non ad una differenza nel grado di autoincompatibilità.

Tra i 4 trattamenti di incrocio la differenza sia nel *fruit set* che nel *seed set* risulta minima e non significativa, ciò significa che incrociando in tutti i modi possibili le due forme estreme, la *fitness* rimane invariata e in tutti i 4 casi molto alta. Questa situazione si riscontra anche nel genere *Narcissus* (anch'esso appartenente all'ordine Asparagales, ma alla famiglia Amaryllidaceae): *Narcissus assoanus* Dufour presenta dimorfismo dell'altezza dello stigma e in tale specie sia gli incroci tra individui con morfi uguali sia quelli tra morfi diversi hanno mostrato una fertilità paragonabile, indicando l'assenza di incompatibilità eteromorfa (Baker & al., 2000b). Anche in *Narcissus papyraceus* Ker Gawl., specie che ancora una volta mostra dimorfismo dell'altezza dello stigma, non risultano differenze significative nella fertilità degli individui sottoposti a impollinazione incrociata tra gli stessi morfi e tra morfi diversi (Arroyo & al., 2002).

Rilevante è l'assenza nel *fruit set* di frutti prodotti dal trattamento volto a verificare la presenza di apomissia; ciò significa che nella specie la riproduzione per via apomittica non è possibile. Da un punto di vista biologico-funzionale questo implica che i semi di tale specie devono essere prodotti necessariamente da un evento di fecondazione dell'ovulo da parte del polline, ossia è necessario che il gamete femminile e quello maschile si incontrino.

## **4.2. Distanza stigma-antere**

Per quanto riguarda gli individui di controllo, dalle misurazioni effettuate è possibile affermare che la maggior parte di questi possiede una distanza stigma-antere che sta a metà tra il morfotipo Short estremo e quello Long estremo; la distribuzione della distanza stigma-antere risulta di tipo normale. Dalla tipologia di distribuzione che assumono gli individui nel grafico di Figura 16, si evince che nella specie è presente una variabilità continua dell'altezza dello stigma rispetto alle antere, in quanto tutte le classi di altezza sono rappresentate nella popolazione studiata; le antere invece assumono una

posizione sempre molto simile in tutti gli individui analizzati. Per tale motivo quindi questa variabilità può essere definita “monomorfismo” dell’altezza dello stigma.

La designazione dei due morfotipi Short e Long risulta quindi non ben definita, ma piuttosto arbitraria, dovuta alla mancanza di una soluzione di continuità. Al contrario, in uno studio effettuato per il genere *Narcissus* viene indicato come nelle specie *N. assoanus* e *N. dubius* Gouan vi sia la presenza di dimorfismo dell’altezza dello stigma, per cui è lecito parlare di polimorfismo a causa dell’esistenza ben distinta del morfo Long, con stigma al di sopra del livello delle antere e del morfo Short, in cui lo stigma è situato al di sotto di queste; l’altezza delle antere anche in questo caso non varia (Baker & al., 2000a).

La separazione tra stigma e antere probabilmente ha lo scopo di evitare l’autoimpollinazione.

Sempre nelle piante di controllo si può affermare che quanto minore è la distanza tra stigma e antere tanto maggiore è il *seed set* e il numero di semi prodotto.

I caratteri del fiore sono compatibili con la tipologia di impollinazione entomofila, confermata nel genere (Mathew, 1982). Le specie che vengono impollinate prevalentemente per via entomofila presentano alcune caratteristiche che le accomunano; si parla di sindrome da impollinazione zoofila (nello specifico, entomofila) per definire quella varietà di caratteri dei fiori che si sono evoluti in risposta alla selezione naturale imposta da vettori animali di polline, quali molte specie di insetti, alcuni uccelli, ecc. (Fægri & van der Pijl, 1979; Proctor & al., 1996; Fenster & al., 2004). Le specie che si riproducono tramite impollinazione entomofila possiedono un fiore di norma vistoso, colorato e profumato; spesso vengono prodotte dalla pianta stessa alcune sostanze che attraggono l’insetto impollinatore come ad esempio il nettare, sostanza zuccherina altamente energetica che si trova in strutture chiamate nettarii situati in molti casi alla base del fiore e che funge da ricompensa alimentare per l’impollinatore (Schemske & Bradshaw, 1999; Wilson & al., 2004; Harder & Barrett, 2006). La presenza di nettarii in *Crocus etruscus* è confermata da Mathew (1982), questi si trovano all’apice dell’ovario e il nettare prodotto risale il tubo del perigonio per capillarità, fino a giungere alla fauce pubescente dove viene trattenuto.



Figura 22. Individuo di *Crocus etruscus*; la freccia mostra la parte del fiore in cui il nettare, dopo essere risalito dai nettarii, viene trattenuto.

Quando gli insetti si spingono in basso per avvicinarsi al fiore, succhiare il nettare e prelevare il polline, nel contempo prelevano e trasferiscono il polline da un fiore all'altro, quindi fungono anche da impollinatori. Tuttavia sugli stigmi dei morfi corti giungerà anche polline *self*, poiché può avvenire agevolmente il contatto tra antere e stigma dello stesso fiore. Nei morfi con stigma lungo al contrario l'autogamia risulta difficoltosa, mentre verrà favorita l'impollinazione incrociata, con tutti i benefici nella *fitness* della popolazione che questa arreca (Wright & al., 2008).

Per il futuro, alla luce della separazione tra stigma e antere presente nella specie e del possibile diverso approccio degli impollinatori sui diversi morfi, sarà interessante effettuare uno studio mirato riguardante la tipologia di insetti impollinatori che frequentano la specie, le loro attitudini ecologiche per quanto riguarda la frequentazione di questi fiori e la presenza e variazione di *pollen limitation* tra i morfi.

Nella stazione D solo 3 individui di controllo sui circa 15 totali presi in esame in ciascuna stazione, hanno prodotto frutto. Inoltre, la distanza tra stigma e antere risulta la meno variabile di tutte e 5 le stazioni; è importante però notare che per la stazione D ci sono solo 3 misurazioni della distanza stigma-antere che sono quelle dei 3 individui che hanno prodotto frutto.

In conclusione, si può ragionevolmente affermare in base ai risultati ottenuti che l'importanza del concetto dei morfi per questa specie può essere ricondotta alle implicazioni puramente morfologico-strutturali derivanti da essi, senza chiamare in causa adattamenti di tipo fisiologico; esiste un meccanismo fisiologico di base che induce una parziale autoincompatibilità, ma tale meccanismo in base allo studio effettuato non risulta diverso nei due morfotipi.

### **4.3. Massa semi**

Dall'analisi della massa media dei semi dei vari trattamenti e dei controlli non emerge nessuna rilevante differenza dal punto di vista statistico tra le masse delle varie tipologie di semi; la massa media di tutti i semi risulta simile.

Non esiste una relazione significativa tra la distanza stigma-antere e la massa media dei semi degli individui di controllo.

Riguardo, invece, alla massa media dei semi in ciascuna stazione, si può affermare che nella stazione D questa risulta inferiore rispetto alle altre stazioni, il che denota una qualità dei semi peggiore. Dalle analisi dei confronti a coppie emerge che la stazione D risulta diversa da tutte le altre; la stazione E è quella più simile alla D, infatti presentano entrambe un terreno compatto e coeso.

La stazione D, con molta probabilità, non presenta le condizioni adatte per lo sviluppo ottimale della specie e ciò è dimostrato dalla scarsa produzione di frutti e dalla cattiva qualità derivante dalla scarsa massa media dei semi prodotti, anche se per confermare questa ipotesi sarebbero necessarie ulteriori analisi. Probabilmente il terreno molto compatto, costituito in prevalenza da roccia affiorante, e l'esposizione verso nord con conseguente minore insolazione, determinano negli individui della stazione D una *fitness* minore rispetto a quella che si riscontra negli individui delle altre stazioni.



#### **4.4. Indici di compatibilità**

Per testare il livello di autocompatibilità della specie, sono stati utilizzati 3 indici. I valori di tali indici risultano molto bassi, quindi confermano l'autoincompatibilità della specie, anche se non totale.

Visto il livello di autoincompatibilità non è possibile affermare che la forma Short esista con lo scopo di garantire con l'autoimpollinazione la perpetuazione della specie allorché la densità di individui giunga ad essere troppo scarsa per permettere il mantenimento del livello di popolazione attraverso l'impollinazione incrociata, in quanto se la riproduzione avvenisse solo tramite autogamia, la quantità di semi che verrebbero prodotti non risulterebbe sufficiente a mantenere una quantità di individui accettabile nella popolazione. La specie però, non essendo completamente autoincompatibile, può adottare la strategia autogama per dare un contributo al mantenimento della popolazione, in particolare laddove gli individui presentino una densità minore o in annate particolarmente sfavorevoli per le attività degli impollinatori (Carta, 2012).

È possibile invece ragionevolmente supporre che la forma Long, che presenta lo stigma in posizione più alta rispetto alle antere, abbia lo scopo di evitare l'autogamia.

Si possono osservare quindi due strategie diverse, entrambe volte a limitare l'autogamia: la presenza di morfi Long e l'autoincompatibilità parziale (Navarro & al., 2012).

#### **4.5. Discussione metodologica**

Dai risultati ottenuti si è in grado di poter affermare che alcune delle metodologie utilizzate nello studio dovrebbero essere migliorate; eventuali errori commessi in fase di disegno sperimentale sono stati identificati così da poter essere in grado di evitarli in uno studio futuro.

La perdita di alcuni cappucci, in quantità tale che ha comunque permesso il proseguimento dello studio, è avvenuta a causa degli agenti atmosferici, del dilavamento delle acque sul terreno che possono averne modificato la collocazione e talvolta dell'attività di calpestio e grufolamento dei cinghiali. Sarebbe quindi opportuno

monitorare più spesso la situazione dell'area in studio, produrre cappucci più solidi e resistenti o considerare una perdita nel numero di cappucci posti *in loco* quindi sovradimensionare la loro collocazione.

La ripetizione delle prove su più anni consecutivi andrebbe a migliorare ulteriormente l'analisi e permetterebbe di affinare le tecniche metodologiche in base all'esperienza acquisita, di ricavare un maggior numero di dati da poter discutere e di limitare la presenza di errori sperimentali.

## 5. CONCLUSIONI

Gli studi effettuati hanno permesso di giungere ad interessanti conclusioni riguardo l'ecologia e la biologia riproduttiva della specie *Crocus etruscus* Parl., endemita della Toscana meridionale.

Per quanto riguarda l'altezza dello stigma, questa non è simile in tutti gli individui ma varia da più in alto a più in basso rispetto alle antere (Peruzzi & Carta, 2011); tale variazione risulta di tipo continuo, per questo motivo non può essere definita polimorfismo, ma "monomorfismo". Sono stati effettuati alcuni esperimenti *in situ*, per stabilire se l'altezza variabile dello stigma potesse incidere in qualche maniera sulla *fitness* di frutti e semi prodotti; il rapporto tra lunghezza dello stilo e qualità dei semi prodotti risulta essere inversamente proporzionale: minore è la distanza tra stigma e antere, maggiore è il numero di semi prodotti.

La *fitness* a livello di produzione di frutti e semi che deriva da riproduzione autogama è fortemente inferiore rispetto a quella che deriva dalla riproduzione che avviene tramite l'incrocio di individui diversi; per questo motivo, possiamo definire la specie come parzialmente autoincompatibile (Lloyd & Schoen, 1992). Questo è confermato anche dai risultati degli indici di compatibilità applicati. È stato visto che l'impollinazione incrociata tra i morfi Short e Long non porta a differenze nella quantità di frutti e semi prodotti, che risulta in tutti i casi molto alta; la separazione tra stigma e antere esiste probabilmente con lo scopo di limitare il più possibile l'autoimpollinazione. Particolarmente interessante è il fatto che la specie limiti l'autogamia con l'autoincompatibilità, ma mostri anche un certo grado di separazione spaziale delle strutture riproduttive maschili e femminili all'interno dello stesso fiore; poiché quest'ultimo risulta un importante carattere evolutivo, ulteriori indagini sono necessarie per monitorare la variabilità inter- ed intra-popolazione e comprenderne il significato funzionale (Carta & al., 2013). La specie non può riprodursi per via apomittica.

Data la parziale autoincompatibilità della specie, anche se allo stato attuale non è ritenuta in pericolo, il futuro però rimane piuttosto incerto qualora gli individui nella

popolazione iniziassero a scarseggiare. Per la conservazione della specie sarebbe opportuno ridurre le minacce, al momento solo potenzialmente dannose, a cui questa è sottoposta, in generale tutelando soprattutto i margini delle aree boscate dove la specie vive e che sono le parti più a rischio in quanto zone tampone tra il nucleo del bosco e l'esterno. Inoltre, un importante ruolo possono assumere interventi di conservazione *ex situ*, tramite la banca dei semi e del germoplasma, dove il materiale vegetale prelevato *in situ* può essere conservato in condizioni ottimali per molti anni (Bacchetta & al., 2006).

Per il futuro potrebbero essere programmate alcune prove di germinazione dei semi prodotti, di accrescimento delle plantule e misure della massa dei cormi negli anni a venire in modo da permettere uno studio di *fitness* della specie sul lungo periodo. Inoltre, potrebbe essere programmato uno studio sull'ereditarietà della lunghezza dello stilo per questa specie utilizzando di nuovo le prove di germinazione, in modo da testare la presenza di ereditarietà per questo tratto e conoscere il modo in cui questa si manifesta nella progenie.

Concludendo, dal presente studio emerge la necessità di compiere nuove e mirate indagini volte a comprendere la biologia dell'impollinazione, con particolare riferimento al ruolo adattativo della variabilità dell'altezza dello stigma (Carta & al., 2013).

## 6. LETTERATURA CITATA

- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009. *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*. Botanical Journal of the Linnean Society, 16(2): 105-121.
- ARRIGONI P.V., 1974. *Rapporti floristici tra l'Arcipelago Toscano e le terre vicine*. Lavori della Società Italiana di Biogeografia, n.s., 5: 55-65.
- ARRIGONI P.V., BALDINI R.M., FOGGI B., SIGNORINI M.A., 2003. *Analysis of the floristic diversity of the Tuscan Archipelago for conservation purposes*. Bocconea, 16(1): 245-259.
- ARROYO J., BARRETT S.C.H., HIDALGO R., COLE W.W., 2002. *Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae)*. American Journal of Botany, 89(8): 1242-1249.
- BACCHETTA G., FENU G., MATTANA E., PIOTTO B., VIREVAIRE M., 2006. *Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma*. APAT, Roma.
- BAKER A.M., THOMPSON J.D., BARRETT S.C.H., 2000a. *Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. I. Floral variation and style-morph ratios*. Heredity, 84: 502-513.
- BAKER A.M., THOMPSON J.D., BARRETT S.C.H., 2000b. *Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. II. Fitness comparisons between style morphs*. Heredity, 84: 514-524.
- BALDINI R.M., 1990. *Karyological observations on two *Crocus* species (Iridaceae) from Tuscany (Italy)*. Caryologia, 43: 341-345.

- BARRETT S.C.H., JESSON L.K., BAKER A.M., 2000. *The Evolution and Function of Styler Polymorphisms in Flowering Plant*. Annals of Botany, 85(Supplement A): 253-265.
- BASKIN J., BASKIN C.C., 2004. *A classification system for seed dormancy*. Seed Science Research, 14: 1-16.
- BERNETTI G., 2005. Atlante di selvicoltura. Edagricole, Bologna.
- BILZ M., KELL S.P., MAXTED N., LANSDOWN R.V., 2011. European Red List of Vascular Plants. Publications office of the European Union, Luxemburg.
- BRIGHTON C.A., MATHEW B., MARCHANT C.J., 1973. *Chromosome counts in the genus Crocus (Iridaceae)*. Kew Bulletin, 28(3):451-464.
- CARTA A., 2012. *Mating system, phenology of seed dormancy and germination ecology in the endemic plant Crocus etruscus (Iridaceae)*. Doctorate School in Biological and Molecular Sciences - Semestral report. University of Pisa.
- CARTA A., HARPKE D., TOMOVIC G., RANDELOVIC V., RANDELOVIC N., BLATTNER F.R., PERUZZI L., 2013. *Crocus serie Verni (Iridaceae) in Italia: novità tassonomiche*. Società Botanica Italiana, Gruppo per la Floristica, Roma (Italy): 49-50.
- CARTA A., PIERINI B., ALESSANDRINI A., FRIGNANI F., PERUZZI L., 2010. *Contributo alla conoscenza della flora vascolare endemica di Toscana ed aree contermini. 1. Crocus etruscus (Iridaceae)*. Informatore Botanico Italiano, 42(1): 47-52.
- CESANA B.M., ANTONELLI P., PEA G., 2012. La statistica per le scienze biomediche. Libreria Universitaria Edizioni, Padova.

- CHARLESWORTH D., CHARLESWORTH B., 1987. *Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences*. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 237-268.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (Eds.), 2005. An annotated checklist of the Italian vascular flora. Palombi Editori, Roma.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997. *Liste rosse regionali delle piante d'Italia*. Società Botanica Italiana, Università di Camerino.
- CORSI G., GARBARI F., 1991. *Elba, isola d'erba*. Quaderni di S. Caterina, 2: 101-103.
- DEL GUACCHIO E., CAPUTO P., 2008. *Crocus imperati and Crocus suaveolens (Iridaceae), two controversial endemic crocuses from central and southern Italy. Morphometrics, lectotypification and chorology*. Botanical Journal of the Linnean Society, 158: 194-214.
- DEL PRETE C., GARBARI F., 1985. *Le piante endemiche dell'Arcipelago Toscano*. In: AA.VV., *Il sistema museale dell'Arcipelago Toscano*. Rivista Italiana di Studi Napoleonici (Suppl.), Portoferraio: 51-60. Giardini Editore, Pisa.
- DOWDY S., WEARDEN S., 1983. *Statistic for Research*. Wiley, Hoboken, NJ.
- FÆGRI K., VAN DER PIJL L., 1979. *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- FENSTER C.B., ARMBRUSTER W.S., WILSON P., DUDASH M.R., THOMSON J.D., 2004. *Pollination syndromes and floral specialization*. Annual Review of Ecology and Systematics, 35(1): 375-403.
- FIORI A., 1923-1929. *Nuova Flora Analitica d'Italia*, 1-2. Tipografia Ricci, Firenze.

- FOGGI B., CARTEI L., PIGNOTTI L., SIGNORINI M.A., VICIANI D., DELL'OLMO L., MENICAGLI E., 2006. *Il paesaggio vegetale dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). Studio di fitosociologia e cartografico*. Fitosociologia, 43(1), Suppl. 1: 3-95.
- FOSSI-INNAMORATI T., 1991. *La flora vascolare dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). Parte terza*. Webbia, 45(1): 137-185.
- GORI C., 1993. *Inventario floristico ed analisi fitogeografica delle isole dell'Arcipelago Toscano*. Tesi di Dottorato in Sistematica ed Ecologia vegetale. Università di Firenze.
- GRILLI CAIOLA M., CANINI A., 2010. *Looking for Saffron's (Crocus sativus L.) parents*. Functional Plant Science and Biotechnology, 4: 1-14.
- GUCCIONE M., SCHILLECI F., 2010. Le reti ecologiche nella pianificazione territoriale ordinaria. Primo censimento nazionale degli strumenti a scala locale. Rapporti 116/2010, ISPRA, Roma.
- HARDER L.D., BARRETT S.C.H., 2006. Ecology and Evolution of Flowers. Oxford University Press, Oxford, UK.
- HARPKE D., MENG S., RUTTEN T., KERNDORFF H., BLATTNER F.R., 2013. *Phylogeny of Crocus (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: Ancient hybridization and chromosome number evolution*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 66(3): 617-627.
- HOSMER D.W. Jr., LEMESHOW S., STURDIVANT R.X., 2013. Applied Logistic Regression. 3<sup>rd</sup> edition. Wiley, Hoboken, NJ.
- IUCN, 2001. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.



- LLOYD D. G., SCHOEN D.J., 1992. *Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions*. International Journal of Plant Sciences, 153(3): 358-369.
- MATHEW B., 1982. *The Crocus*. A revision of the genus *Crocus* (Iridaceae). Timber Press, Portland.
- NAVARRO L., AYENSA G., FERRERO V., SANCHEZ J.M., 2012. *The avoidance of self-interference in the endemic daffodil Narcissus cyclamineus (Amaryllidaceae)*. Plant Ecology, 213: 1813-1822.
- PARLATORE F., 1858. Flora Italiana, 3: 228-229. Le Monnier, Firenze.
- PERUZZI L., CARTA A., 2011, *Crucus ilvensis sp.nov.(sect. Crocus, Iridaceae), endemic to Elba island (Tuscan archipelago, Italy)*. Nordic Journal of Botany, 29: 6-13.
- PERUZZI L., HARPKE D., CARTA A., 2011. *Risultati preliminari sull'evoluzione e filogenesi, nell'ambito della serie Verni (Crocus, Iridaceae), dei due crochi endemici di Toscana*. Società Botanica Italiana, Gruppo per la biosistemica vegetale: 24-25.
- PETANIDOU T., GODFREE R.C., SONG D.S., KANTSA A., DUPONT Y.L., WASER N.M., 2012. *Self-compatibility and plant invasiveness: Comparing species in native and invasive ranges*. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 14(1): 3-12.
- PETERSEN G., SEBERG O., THORSOE S., JORGENSEN T., MATHEW B., 2008. *A phylogeny of the genus Crocus (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions*. Taxon, 57: 487-499.
- PIGNATTI S., 1982. Flora d'Italia. Edagricole, Bologna.

- PROCTOR M., YEO P., LACK A., 1996. The natural history of pollination. Harper Collins, London.
- RAUNKIÆR C.C., 1934. The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography. Oxford University Press, Oxford.
- ROSSI G., MONTAGNANI C., GARGANO D., PERUZZI L., ABELI T., RAVERA S., COGONI A., FENU G., MAGRINI S., GENNAI M., FOGGI B., WAGENSOMMER R.P., VENTURELLA G., BLASI C., RAIMONDO F.M., ORSENIGO S. (Eds.), 2013. *Lista Rossa della Flora Italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate*. Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma.
- SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 2005. Handbook of the Convention on Biological Diversity Including its Cartagena Protocol on Biosafety, 3<sup>rd</sup> edition. Montreal, Canada.
- SELVI F., 1996. *Flora and phytogeography of the volcanic dome of Monte Amiata*. Webbia, 50(2): 265-310.
- SCHEMSKE D.W., BRADSHAW H.D., 1999. *Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (Mimulus)*. PNAS, 96(21): 11910-11915.
- SHAPIRO S.S., WILK M.B., 1965. *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. Biometrika, 52(3-4): 591-611.
- SIEGEL S., TUKEY J.W., 1960. *A nonparametric sum of ranks procedure for relative spread in unpaired samples*. Journal of the American Statistical Association, 55(291): 429-445.
- SIGNORINI M.A., FOGGI B., BALDINI R.M., 2002. *Escursione all'Arcipelago Toscano*. Informatore Botanico Italiano, 34(1): 232-234.

WILSON P., CASTELLANOS M.C., HOGUE J.N., THOMSON J.D., ARMBRUSTER W.S., 2004. *A multivariate search for pollination syndromes among penstemons*. *Oikos*, 104(2): 345-361.

WRIGHT S.I., NESS R.W., FOXE J.P., BARRETT S.C.H., 2008. *Genomic consequences of outcrossing and selfing in plants*. *International Journal of Plant Science*, 169(1): 105-118.

ZANI S., 1994. *Analisi dei dati statistici*, vol. I. Giuffrè editore, Milano.

ZAPATA T.R., ARROYO M.T.K., 1978. *Plant Reproductive Ecology of a Secondary Deciduous Tropical Forest in Venezuela*. *Biotropica*, 10(3): 221-230.

## 7. APPENDICE

### 1. *Fruit set* trattamenti

Trattamento	y	n	%
SAS	6	18	33
SAL	4	20	20
FAS	7	13	54
FAL	8	18	44
CLL	16	16	100
CSS	15	15	100
CLS	13	13	100
CSL	18	20	90
APO	0	14	0
Controlli	19	20	95

### 2. *Seed set* trattamenti

Trattamento	Stazione	y	n	%
SAS	A	10	20	50
SAS	B	5	25	20
SAS	B	0	25	0
SAS	B	0	20	0
SAS	B	0	30	0
SAS	C	7	21	33.333
SAL	C	7	23	30.435
SAL	C	0	24	0
SAL	C	0	24	0
SAL	C	6	24	25
FAS	B	4	9	44.444
FAS	C	5	20	25
FAS	C	1	10	10
FAS	D	5	16	31.25
FAS	D	0	13	0
FAS	E	7	25	28
FAS	E	1	5	20
FAL	A	4	15	26.667
FAL	A	2	20	10
FAL	A	7	18	38.889
FAL	A	8	18	44.444
FAL	D	1	21	4.7619
FAL	D	5	20	25
FAL	D	6	21	28.571
FAL	D	1	16	6.25
CLL	A	25	33	75.758
CLL	A	21	33	63.636

CLL	A	27	28	96.429
CLL	A	24	27	88.889
CLL	A	22	23	95.652
CLL	A	11	27	40.741
CLL	B	19	25	76
CLL	C	6	12	50
CLL	C	32	33	96.97
CLL	D	12	26	46.154
CLL	D	9	22	40.909
CLL	D	24	28	85.714
CLL	E	19	21	90.476
CLL	E	20	23	86.957
CLL	E	32	36	88.889
CLL	E	24	25	96
CSS	A	21	28	75
CSS	A	16	24	66.667
CSS	A	19	30	63.333
CSS	B	15	25	60
CSS	B	18	21	85.714
CSS	C	20	26	76.923
CSS	C	20	23	86.957
CSS	D	25	29	86.207
CSS	D	15	24	62.5
CSS	D	18	22	81.818
CSS	D	17	22	77.273
CSS	E	14	24	58.333
CSS	E	19	26	73.077
CSS	E	24	25	96
CSS	E	17	28	60.714
CLS	A	19	25	76
CLS	A	13	23	56.522
CLS	A	28	32	87.5
CLS	D	25	29	86.207
CLS	D	18	24	75
CLS	D	18	32	56.25
CLS	D	13	16	81.25
CLS	E	14	30	46.667
CLS	E	14	22	63.636
CLS	E	22	27	81.481
CLS	E	10	20	50
CLS	E	12	17	70.588
CLS	E	18	20	90
CSL	A	12	21	57.143
CSL	A	22	31	70.968
CSL	A	16	30	53.333
CSL	A	33	34	97.059
CSL	B	32	33	96.97
CSL	B	26	28	92.857
CSL	B	25	29	86.207
CSL	C	23	26	88.462
CSL	C	26	30	86.667
CSL	C	20	27	74.074
CSL	D	14	19	73.684
CSL	D	11	24	45.833

CSL	D	17	20	85
CSL	D	13	16	81.25
CSL	D	12	18	66.667
CSL	D	9	20	45
CSL	D	11	15	73.333
CSL	E	13	23	56.522
Controlli	A	17	21	80.952
Controlli	A	18	21	85.714
Controlli	A	16	20	80
Controlli	A	14	20	70
Controlli	A	3	20	15
Controlli	A	26	29	89.655
Controlli	A	9	19	47.368
Controlli	A	16	24	66.667
Controlli	A	26	32	81.25
Controlli	A	7	23	30.435
Controlli	A	21	25	84
Controlli	A	15	22	68.182
Controlli	A	9	25	36
Controlli	A	30	40	75
Controlli	A	26	28	92.857
Controlli	A	22	35	62.857
Controlli	A	24	28	85.714
Controlli	A	24	35	68.571
Controlli	B	19	25	76
Controlli	B	20	22	90.909
Controlli	B	21	30	70
Controlli	B	25	32	78.125
Controlli	B	14	19	73.684
Controlli	B	28	29	96.552
Controlli	B	34	39	87.179
Controlli	B	27	30	90
Controlli	B	24	29	82.759
Controlli	B	29	32	90.625
Controlli	B	17	26	65.385
Controlli	B	17	23	73.913
Controlli	B	18	33	54.545
Controlli	B	28	33	84.848
Controlli	B	10	13	76.923
Controlli	B	24	28	85.714
Controlli	C	26	28	92.857
Controlli	C	29	30	96.667
Controlli	C	36	38	94.737
Controlli	C	15	26	57.692
Controlli	C	23	32	71.875
Controlli	C	24	26	92.308
Controlli	C	9	25	36
Controlli	C	17	29	58.621
Controlli	D	16	20	80
Controlli	D	12	21	57.143
Controlli	D	14	19	73.684
Controlli	E	22	25	88
Controlli	E	11	15	73.333
Controlli	E	25	28	89.286

Controlli	E	15	22	68.182
Controlli	E	8	15	53.333
Controlli	E	26	30	86.667
Controlli	E	17	23	73.913
Controlli	E	16	25	64
Controlli	E	14	24	58.333
Controlli	E	16	25	64
Controlli	E	21	28	75
Controlli	E	24	27	88.889

### 3. Seed set e distanza stigma-antere controlli

Stazione	y	n	Distanza stigma-antere
A	17	21	2.5
A	18	21	-1.28
A	16	20	3.51
A	14	20	4.1
A	3	20	5.8
A	26	29	1.28
A	9	19	6.06
A	16	24	3.22
A	26	32	0.86
A	7	23	2.56
A	21	25	2.99
A	15	22	-0.43
A	9	25	3.65
A	30	40	4.66
A	26	28	7.52
A	22	35	5.91
A	24	28	6.45
A	24	35	5.6
B	19	25	1.2
B	20	22	1.5
B	21	30	3.12
B	25	32	0.01
B	14	19	3.19
B	28	29	-0.2
B	34	39	2.33
B	27	30	2.09
B	24	29	2.91
B	29	32	3.96
B	17	26	1.57
B	17	23	3.28
B	18	33	3.59
B	28	33	-1.38
B	10	13	7.61
B	24	28	2.5
C	26	28	3.55
C	29	30	-2.17
C	36	38	0

C	15	26	3.56
C	23	32	0.7
C	24	26	3.45
C	9	25	8.96
C	17	29	3.53
D	16	20	2.29
D	12	21	1.62
D	14	19	2.55
E	22	25	5
E	11	15	2.09
E	25	28	-0.99
E	15	22	0
E	8	15	3.9
E	26	30	0
E	17	23	5.7
E	16	25	2.76
E	14	24	5.9
E	16	25	5.08
E	21	28	6.26
E	24	27	4.46

#### 4. Misurazioni massa semi trattamenti

Trattamento	Massa (g)	Quantità semi	Media massa singolo seme	Media massa trattamento	SD massa singolo seme
SAS	0.0268	10	0.0027	0.0026	0.0003
SAS	0.0259	10	0.0026		
SAS	0.0217	10	0.0022		
SAS	0.0285	10	0.0029		
SAS	0.0248	10	0.0025		
SAL	0.0131	5	0.0026	0.0024	0.0002
SAL	0.0122	5	0.0024		
SAL	0.013	5	0.0026		
SAL	0.0106	5	0.0021		
SAL	0.0116	5	0.0023		
FAS	0.0227	10	0.0023	0.002	0.0002
FAS	0.0206	10	0.002		
FAS	0.0201	10	0.002		
FAS	0.0176	10	0.0018		
FAS	0.0225	10	0.0023		
FAL	0.0205	10	0.002	0.002	0.0002
FAL	0.0226	10	0.0023		
FAL	0.0226	10	0.0023		
FAL	0.0182	10	0.0018		
FAL	0.0191	10	0.0019		
CLL	0.0646	22	0.0029	0.0025	0.0004
CLL	0.0398	22	0.0018		
CLL	0.0523	22	0.0024		
CLL	0.0579	21	0.0028		



CLL	0.0556	22	0.0025		
CSS	0.0294	19	0.0015	0,0023	0,0006
CSS	0.0421	19	0.0022		
CSS	0.0563	20	0.0028		
CSS	0.0602	20	0.003		
CSS	0.0379	20	0.0019		
CLS	0.0237	16	0.0015	0.002	0.0005
CLS	0.021	12	0.0018		
CLS	0.046	18	0.0026		
CLS	0.0307	15	0.002		
CLS	0.0542	22	0.0025		
CSL	0.0629	22	0.0029	0.0023	0.0004
CSL	0.0525	22	0.0024		
CSL	0.0506	22	0.0023		
CSL	0.0529	22	0.0024		
CSL	0.0384	22	0.0017		

## 5. Misurazioni massa semi e distanza stigma-antere controlli

Stazione	Distanza stigma- antere	Massa (g)	Quantità semi	Media massa singolo seme	Media massa stazione
A	-1.28	0.039	15	0.0026	0.0025
A	7.52	0.0966	26	0.0037	
A	5.6	0.0427	20	0.0021	
A	1.28	0.0454	20	0.0023	
A	4.1	0.0357	15	0.0024	
A	6.45	0.0668	25	0.0027	
A	4.66	0.0675	29	0.0023	
A	6.06	0.0235	9	0.0026	
A	3.51	0.0268	15	0.0018	
A	2.5	0.0369	15	0.0025	
A	0.86	0.0646	23	0.0028	
A	3.65	0.0206	8	0.0026	
A	5.91	0.0467	20	0.0023	
A	2.99	0.0572	24	0.0024	
A	3.22	0.0419	16	0.0026	
A	5.8	0.005	2	0.0025	
A	-0.43	0.0188	10	0.0019	
B	1.57	0.0377	14	0.0027	0.0026
B	2.33	0.0828	33	0.0025	
B	1.5	0.0372	19	0.0019	
B	-1.38	0.0532	26	0.002	
B	1.2	0.0415	18	0.0023	
B	3.59	0.0407	16	0.0025	
B	1.62	0.048	30	0.0016	
B	3.96	0.0832	32	0.0026	
B	-0.2	0.0783	28	0.0028	
B	2.09	0.0628	26	0.0024	
B	3.28	0.08	19	0.0042	
B	3.12	0.0409	18	0.0023	

B	3.19	0.0295	13	0.0023	
B	7.61	0.0396	11	0.0036	
B	2.91	0.0698	23	0.003	
B	2.5	0.0534	23	0.0023	
B	0.01	0.0653	23	0.0028	
C	3.55	0.0514	24	0.0021	0.0026
C	0.7	0.0453	19	0.0024	
C	3.56	0.0363	15	0.0024	
C	-2.17	0.0872	29	0.003	
C	3.53	0.0434	15	0.0029	
C	3.45	0.0806	24	0.0034	
C	0	0.0968	35	0.0028	
C	8.96	0.0121	7	0.0017	
D	1.62	0.0136	7	0.0019	0.0015
D	2.55	0.019	15	0.0013	
D	2.99	0.0161	13	0.0012	
E	3.9	0.0181	8	0.0023	0.0023
E	0	0.0359	14	0.0026	
E	5	0.05	20	0.0025	
E	5.9	0.0238	14	0.0017	
E	5.8	0.0354	16	0.0022	
E	2.09	0.0155	11	0.0014	
E	2.76	0.053	15	0.0035	
E	6.26	0.0592	23	0.0026	
E	4.46	0.0574	25	0.0023	
E	0	0.038	17	0.0022	
E	-0.99	0.0495	23	0.0022	
E	5.7	0.0348	17	0.002	

Significato delle sigle:

y = semi

n = semi + ovuli

## RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo studio, mi preme ringraziare alcune persone che, in un modo o nell'altro, mi hanno supportata nella fase di realizzazione di questa tesi.

Il primo ringraziamento va ai miei relatori: Dr. Gianni Bedini, che mi ha seguito in ogni passo e con i suoi sapienti consigli mi ha indirizzato verso la realizzazione della tesi, e Dr. Angelino Carta che pazientemente ha sempre risolto i miei dubbi e mi ha aiutato nel lavoro di tirocinio con grande passione.

Ringrazio i miei controrelatori, Dr. Lorenzo Peruzzi e Dr.ssa Daniela Ciccarelli, per avermi guidato con spirito critico verso la meta finale.

Un ringraziamento va anche a tutto il personale dell'Orto Botanico, per l'aiuto, la simpatia e la disponibilità dimostrata nei miei confronti.

Per l'appoggio morale e la pazienza, ringrazio i miei genitori: babbo Giancarlo e mamma Gabriella.

Un ringraziamento speciale ad Andrea, per l'infinito sostegno che mi ha offerto.

Grazie anche a tutte le amiche e gli amici, quelli che ho conosciuto durante il percorso universitario e che hanno condiviso con me gioie e dolori accademici, e quelli che pur non avendo condiviso con me gli studi universitari, hanno saputo donarmi grande sostegno morale e tanta allegria.

Non posso dimenticare di ringraziare me stessa, poiché questo è il frutto dei miei studi e della tenacia e caparbia che ho sempre impiegato per il raggiungimento dei miei obbiettivi.